

**RYPsin, HÄRKÄPAVUN JA
SPIRULINA PLATENSIS -MIKROLEVÄN VAIKUTUS FOSFORIN
HYVÄKSIKÄYTTÖÖN MAIDONTUOTANNOSSA**

Sanna-Kaisa Kopponen
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden osasto
Kotieläinten ravitsemustiede
Toukokuu 2018

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden osasto	
Tekijä — Författare — Author Sanna-Kaisa Kopponen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Rypsin, härkäpavun ja <i>Spirulina platensis</i> -mikrolevän vaikutus fosforin hyväksikäyttöön maidontuotannossa			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kotieläinten ravitsemustiede			
Työn laji — Arbetets art — Level Maisterintutkielma		Aika — Datum — Month and year Toukokuu 2018	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 58 s.
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Vesistöjä rehevöittävästä fosforikuormituksesta 60 % on peräisin maataloudesta. Ruokinnalla voidaan vaikuttaa lypsylehmien fosforipäästöihin. Rypsin (<i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>Oleifera</i>) siemenistä saatavia puristeita ja rouheita käytetään yleisesti lypsylehmien valkuaisrehuna niiden hyvän maitotuotosvasteen vuoksi. Ne kuitenkin sisältävät paljon fosforia. Ylimääräinen fosfori erittyy pääasiassa sontaan, jonka takia ruokinnan fosforipitoisuus tulisi pitää kohtuullisena. Härkäpavun (<i>Vicia faba</i> L.) siemenen fosforipitoisuus on pienempi kuin rypsirehujen, mutta todennäköisesti pienemmän metioniinipitoisuuden vuoksi sen maitotuotosvaste ei ole yhtä hyvä kuin rypsirehujen. Maito on iso fosforinielu, joten hyvän maitotuotoksen ylläpito on tärkeää samalla kun ruokinnan fosforipitoisuutta pienennetään. Tämän maisterintutkielman tavoitteena oli verrata rypsirouheen, härkäpavun siemenen ja <i>Spirulina platensis</i> -mikrolevän vaikutuksia fosforin hyväksikäyttöön maidontuotannossa.</p> <p>Koe suoritettiin Viikin opetus- ja tutkimustilalla Helsingin Yliopistossa keväällä 2015. Tutkimuksessa verrattiin eri valkuaisrehujen vaikutusta lypsylehmien kuiva-aineen syöntiin, maitotuotokseen, fosforin saantiin, maidon, sonnan ja virtsan fosforipitoisuuteen sekä fosforin hyväksikäyttöön. Tutkimus oli kaksinkertainen 4 x 4 latinalainen neliö, jossa oli neljä ruokintaa ja neljä kolmen viikon jaksoa. Koeasetelma oli 2 x 2 faktoriaalinen, tutkittavina tekijöinä oli väkirehun valkuaisäydennyksen raaka-aine. Perusvalkuaisrehuna oli rypsirouhe tai härkäpapu, joiden valkuaisesta korvattiin spirulinalla 0 % tai 50 %. Koekäsittelyt olivat isonitrogeeniset valkuaisrehusta saatavan valkuaisen suhteen. Kokeessa oli kahdeksan vähintään kaksi kertaa poikinnutta ayrshire-lehmää, jotka söivät seosrehua vapaasti. Valkuaisrehun lisäksi seosrehussa oli nurmisäilörehua, ohraa, melassileikettä ja kivennäistä. Seosrehun karkearehu: väkirehu - suhde kuiva-aineessa oli 55:45.</p> <p>Ruokintojen fosforipitoisuudet olivat 3,93 g/kg ka (rypsi), 3,90 g/kg ka (rypsi+spirulina), 3,75 g/kg ka (härkäpapu) ja 3,76 g/kg ka (härkäpapu+spirulina). Kuiva-aineen syönnissä ei ollut eroa rypsi- ja härkäpapuruokintojen välillä, mutta perusvalkuaisrehun osittainen korvaaminen spirulinalla pienensi kuiva-aineen syöntiä. Maitotuotos oli suurempi rypsi- kuin härkäpapuruokinnalla ja suurempi härkäpapuruokinnalla. Fosforin saanti oli suurempaa ja sonnan fosforipitoisuus oli suuntaa-antavasti suurempi rypsi- kuin härkäpapuruokinnalla. Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, maitotuotos pieneni rypsi- kuin härkäpapuruokinnalla. Fosforin saanti oli suurempaa ja sonnan fosforipitoisuus oli suuntaa-antavasti suurempi rypsi- kuin härkäpapuruokinnalla. Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, fosforin saanti pieneni, mutta tällä ei ollut vaikutusta sonnan fosforipitoisuuteen. Fosforin hyväksikäyttö maidontuotantoon oli yhtä tehokasta rypsi- kuin härkäpapuruokinnalla, ja perusvalkuaisrehun korvaaminen osittain spirulinalla tehosti fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa suuntaa-antavasti.</p> <p>Tutkimuksen perusteella härkäpapu ja spirulina eivät ole maitotuotosvasteeltaan rypsin veroisia valkuaisrehuja lypsylehmän ruokinnassa. Ruokinta, joka sisältää sekä härkäpapua että spirulinaa, saattaisi olla fosforin hyväksikäytön kannalta hyvä vaihtoehto, koska tällä ruokinnalla maitotuotos oli suurempi kuin pelkällä härkäpapuruokinnalla ja fosforin erityis sonnassa oli pienempi kuin rypsi- kuin härkäpapuruokinnalla. Perusvalkuaisrehun osittainen korvaaminen spirulinalla tehosti fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa. Tämä osoitti, että härkäpavun käyttö valkuaisrehuna rypsin sijaan voi olla toimiva keino tehostaa fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa, kun härkäpavun maidontuotantovastetta parannetaan täydentämällä sen aminohappokoostumusta metioniinipitoisella rehulla. Myös spirulina rypsin osittaisena korvaajana on potentiaalinen valkuaisrehu tehostamaan fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa, mikäli löydetään keino ehkäistä spirulinan aiheuttama kuiva-aineen syönnin pienentyminen ja sen myötä pienentynyt maitotuotos.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Fosfori, rypsi, härkäpapu, <i>Spirulina platensis</i> , lypsylehmä, fosforin hyväksikäyttö, mikrolevä			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Maataloustieteiden osasto ja Viikin kampuskirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työt ohjasivat tohtorikoulutettava Marjukka Lamminen ja yliopistonlehtori Seija Jaakkola			

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Departmen Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Sanna-Kaisa Kopponen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title The influence of rapeseed meal, faba bean and microalgae <i>Spirulina platensis</i> on phosphorus utilisation of milk production			
Oppiaine — Läroämne — Subject Animal nutrition			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis		Aika — Datum — Month and year May 2018	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 58 p.
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Agriculture is responsible of 60 % of phosphorus load in water systems. The phosphorus load of milk production can be influenced by dietary phosphorus concentration. Rapeseed (<i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>Oleifera</i>) meals and cakes are commonly used as protein supplement for dairy cows due to their good milk production response. However, the concentration of phosphorus is high in rapeseed meal. Excessive phosphorus is mainly excreted through faeces, which is why dietary phosphorus concentration should be kept moderate. The phosphorus concentration of faba beans (<i>Vicia faba</i> L.) is lower than that of rapeseed meal, but milk production response of faba beans is lower likely due to its lower methionine concentration. Milk is significant phosphorus sink, so it is important simultaneously to maintain milk production while decreasing the dietary phosphorus concentration. The aim of this master's thesis is to compare the effects of rapeseed meal, faba beans and <i>Spirulina platensis</i> microalgae on the phosphorus utilisation in milk production.</p> <p>The experiment was conducted at Viikki Research farm in University of Helsinki during spring 2015. In the experiment, the effects of different protein supplements on the dry matter (DM) and phosphorus intake of dairy cows, milk production, phosphorus concentration of milk, faeces and urine, and phosphorus utilisation were compared. Eight multiparous Finnish Ayrshire cows were used in 4x4 Latin square study with four dietary treatments and four 21-d periods. The arrangement of treatments was 2x2 factorial. Basal protein supplements were either rapeseed meal or rolled faba beans, of whose protein 0 % or 50 % were substituted by spirulina. The diets were isonitrogenous in regards to nitrogen supply from protein feed. Cows had ad libitum access to total mixed ratio (TMR) consisting of experimental protein feed, grass silage, barley, sugar beet pulp and mineral-vitamin mixture. The roughage:concentrate ratio was 55:45 in DM in all experimental TMR's.</p> <p>The phosphorus concentration of the diets was 3,93 g/kg DM (rapeseed meal), 3,90 g/kg DM (rapeseed meal + spirulina), 3,75 g/kg DM (faba beans) and 3,76 g/kg DM (faba beans + spirulina). The DM intake did not differ between faba beans and rapeseed meal, but was decreased when basal protein feed was substituted by spirulina. The substitution of basal protein feed by spirulina decreased milk yield on rapeseed based diets but increased it on faba bean based diets. Phosphorus intake was higher and the phosphorus concentration of faeces tended to be higher on rapeseed than on faba bean based diets. Phosphorus intake was decreased by the substitution of basal protein feed by spirulina but this had no effect on phosphorus concentration of faeces. Phosphorus utilisation in milk production was equally effective with rapeseed and faba bean based diets, and tended to increase when basal protein feed was substituted by spirulina.</p> <p>Based on this study, the milk production response of faba beans and spirulina is lower than that of rapeseed meal. The diet including both faba beans and spirulina might be good alternative in terms of phosphorus utilisation, since on this diet milk yield was higher than on the diet having faba beans as sole protein feed, and the phosphorus concentration of faeces was lower than on rapeseed based diets. The partial substitution of basal protein feed by spirulina increased the efficiency of phosphorus utilisation in milk production. This indicates that faba beans have potential to increase the efficiency of phosphorus utilisation in milk production when the amino acid composition of faba beans are balanced with feeds rich in methionine. Phosphorus utilisation can also be increased by partial substitution of rapeseed meal by spirulina if palatability and subsequently the milk production response of spirulina can be improved.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Phosphorus, rapeseed meal, faba beans, <i>Spirulina platensis</i> , dairy cow, phosphorus utilisation, microalgae			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisors: Doctoral student Marjukka Lamminen and university lecturer Seija Jaakkola			

Sisällys

Lyhenteet.....	5
1 Johdanto.....	6
2 Maaperän fosforin käyttökelpoisuus kasveille	7
3 Rypsi, härkäpapu ja mikrolevät lypsylehmien valkuaisrehuina	8
4 Fosfori	9
4.1 Märehtijöiden fosforin aineenvaihdunta	9
4.2 Lypsylehmän fosforin tarve.....	11
4.3 Fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa ja erityis virtsaan ja sontaan	14
5 Tavoitteet ja hypoteesit	16
6 Aineistot ja menetelmät.....	18
6.1 Koejärjestelyt ja -käsittelyt sekä rehut	18
6.2 Näytteet ja mittaukset.....	21
6.2.1 Näytteiden otto ja mittaukset.....	21
6.2.2 Näytteiden analysointi.....	22
6.3 Fosforianalyysit.....	24
6.3.1 Näytteiden esikäsittely	24
6.3.2 Näytteiden analysointi ICP-menetelmällä.....	25
6.4 Tulosten laskenta ja tilastollinen analyysi.....	28
7 Tulokset.....	30
7.1 Rehujen kemiallinen koostumus	30
7.2 Rehujen syönti, ravintoaineiden saanti ja sulavuus.....	31
7.3 Maidontuotanto	32
7.4 Fosfori	34
8 Tulosten tarkastelu	37
8.1 Rehut ja koeruokinnan koostumus	37
8.2 Syönti ja ravintoaineiden saanti	39
8.3 Maitotuotos.....	41
8.4 Fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa sekä erityis virtsaan ja sontaan	44
9 Johtopäätökset	47
10 Kiitokset	48
11 Lähteet.....	49

Lyhenteet

AIA happoon liukenematon tuhka

EKM energiakorjattumaito

HP perusvalkuaisrehuna härkäpapu

HPSP perusvalkuaisrehuna härkäpavun ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

iNDF sulamaton kuitu

ka kuiva-aine

ME muuntokelpoinen energia

NDF neutraalidetergenttikuitu

R perusvalkuaisrehuna rypsi

RSP perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

VFA haihtuvat rasvahapot

1 Johdanto

Intensiivinen kotieläintuotanto on maatalouden suurin ympäristökuormittaja (Huhtanen ym. 2009). Suomen ympäristökeskuksen (2018) mukaan noin 60 % Suomen vesistöjen fosforikuormituksesta on peräisin maataloudesta. Fosforia päätyy maaperään väkilannoitteista ja kotieläintuotannon lannasta (Niemi ja Väre 2017). Väkilannoitteiden käyttö on vähentynyt viime vuosikymmenien aikana, mutta edelleen karjalannan mukana peltoihin päätyy liikaa fosforia kasvien tarpeisiin nähden (Niemi ja Väre 2017). Kotieläintuotannon alueilla lantaa muodostuu liikaa peltoalaan nähden (Huhtanen ym. 2009, Niemi ja Väre 2017), minkä vuoksi peltojen fosforipitoisuus vaihtelee alueittain suuresti (Uusitalo ym. 2007b). Kasvintuotantoalueilla fosforitaseet ovat pienentyneet, mutta alueilla, joissa kotieläintuotanto on intensiivistä, ne ovat pysyneet suurina (Uusitalo ym. 2007b). Fosforitaseet ovat erityisen suuria maidontuotantoalueilla, jonka vuoksi maitotiloilla on erityisen suuri paine vähentää fosforipäästöjä (Uusitalo ym. 2007b). Peltojen fosforitaseen kääntäminen negatiiviseksi on tehokkain keino vähentää vesistöjen fosforikuormaa (Niemi ja Väre 2017). Silloin peltoihin päätyvän fosforin määrä on pienempi kuin sieltä kasvien mukana poistuva. Esimerkiksi sonnan fosforipitoisuutta voidaan pienentää ruokinnallisoin keinoin (Valk ym. 2002).

Suomessa käytetyimmät lypsylehmien valkuaisrehut ovat rypsi (*Brassica rapa* L. ssp. *Oleifera*) ja rapsi (*Brassica napus* L. *Oleifera*). Suomen valkuaisrehuomavaraisuus on vain 15 % eli täydennysvalkuaisrehuista suurin osa tuodaan ulkomailta (Kaukovirta-Norja ym. 2015). Kotimaisten palkoviljojen, herneen (*Pisum, Sativum* L.) ja härkäpavun (*Vicia faba* L.), käyttö valkuaisrehuna on vasta lisääntymässä. Uusista valkuaislähteistä mikrolevät ovat varteenotettava vaihtoehto (Becker 2007), ja niiden sopivuutta lypsylehmien valkuaisrehuksi tutkitaan. Mikrolevien valkuaissto on huomattavasti suurempi kuin palkoviljojen tai rypsin (van Krimpen ym. 2013), ne kasvavat nopeasti ja niiden tuotanto ei vaadi kasvatukseen maatalousmaata (van Krimpen ym. 2013).

Valkuaisrehujen fosforipitoisuudet voivat olla suuria, jolloin niillä on suuri vaikutus ruokinnan fosforipitoisuuteen ja sitä kautta sonnan fosforipitoisuuteen. Mitä suurempi ruokinnan fosforipitoisuus on, sitä suurempi on sonnan fosforipitoisuus (Morse ym. 1992b, Dou ym. 2010). Kun sonnan fosforipitoisuus lisääntyy, helppoliukoisen fosforin osuus

sonnan kokonaisfosforista lisääntyy (Dou ym. 2010), jolloin ympäristövaikutukset ovat suuremmat. Tavanomaisia valkuaisrehuja, pääasiassa rypsiä, käytettäessä on kuitenkin haastavaa pienentää sonnan fosforipitoisuutta ilman, että maitotuotos pienenee (Yrjänäinen ym. 2003), koska rypsi sisältää runsaasti fosforia. Härkäpapu sisältää huomattavasti vähemmän fosforia kuin rypsi (Luke 2018). Härkäpavulla voidaan osittain korvata rypsiä (Puhakka ym. 2016), jolloin ruokinnan fosforipitoisuus voi pienentyä, joskaan härkäpapu ei ole rypsin veroinen valkuaislähde. Tämän vuoksi on syytä etsiä uusia lypsylehmille soveltuvia laadukkaita valkuaisrehuja, joiden fosforipitoisuus on pienempi kuin rypsin. Esimerkiksi *Spirulina platensis* -mikrolevän eli spirulinan fosforipitoisuus on pienempi kuin rypsin, ja spirulinan suuri raakavalkuaispitoisuus mahdollistaa pienemmän syöttömäärän ja näin pienemmän fosforin saannin. Siten rypsin korvaaminen spirulinalla voi tehostaa fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa lypsylehmien ruokinnassa.

2 Maaperän fosforin käyttökelpoisuus kasveille

Helppoliukoisien fosforin pitoisuus suomalaisissa pelloissa on yleensä suurempi kuin viljelykasvien tarve (Lemola ym. 2009). Huhtasen ym. (2009) ja Lemolan ym. (2009) mukaan väkilannoitteiden fosfori ei anna merkitsevää satovastetta, jos pellon fosforipitoisuus on suuri. Väkilannoitteet ovat myös kalliita, jolloin niiden käyttö ei ole välttämättä taloudellisesti kannattavaa, kun satovaste jää olemattomaksi. Tilojen fosforitaseen pienentäminen on ensisijaisen tärkeää, kun halutaan vähentää peltoihin ja vesistöihin päätyvän fosforin määrää.

Fosforia esiintyy maaperässä sitoutuneena kiintoaineeseen tai liuenneena veteen (Uusitalo ym. 2007a). Fosforin käyttökelpoisuus kasveille vaihtelee, ja maaperän kemialliset ja biologiset prosessit muokkaavat fosforivarastoja ja niiden käyttökelpoisuutta kasveille jatkuvasti (Hartikainen 2002). Vesiliukoinen epäorgaaninen fosfori on heti hyödynnettävissä kasveille, toisin kuin suurin osa kiintoaineeseen sitoutuneesta fosforista (Uusitalo ym. 2007a). Kiintoaineeseen sitoutunut fosfori voi muuntua kasveille käyttökelpoiseen muotoon, mutta tähän vaikuttaa se, miten fosfori on sitoutunut kiintoainekseen (Hartikainen 2002). Kiintoaineeseen sitoutunut ja pelloilta huuhtoutunut fosfori päätyy yleensä vesistöjen pohjaan, josta fosfori voi vapautua veteen rehevöittäen vesistöjä (Uusitalo ym. 2007a). Lisäksi maan tiivistyminen lisää fosforin pintahuuhtoutumista, heikentää kasvien

ravinteiden ottoa ja sitä kautta lannoitteiden hyväksikäyttöä (Niemi ja Väre 2017). Fosforiköyhillä pelloilla maaperä vaikuttaa fosforilannoituksen tarpeellisuuteen. Esimerkiksi happamilla hiekka- ja silttimailla kalkitus parantaa kasveille käyttökelpoisen fosforin määrää pellossa (Saarela ym. 2006). Mavin (2018) ohjeistuksen mukaan sonnan kokonaisfosforista 100 % lasketaan kasveille käyttökelpoiseksi.

3 Rypsi, härkäpapu ja mikrolevät lypsylehmien valkuaisrehuina

Suomessa lypsylehmiä ruokitaan yleisesti nurmisäilörehulla, johon rypsi sopii valkuaisrehuna erinomaisesti (Huhtanen ym. 2011). Suomalaisissa rehutaulukoissa rypsirouheen keskimääräinen raakavalkuaispitoisuus on 379 g/kg ka ja fosforipitoisuus 13,2 g/kg ka (Luke 2018). Rypsin suuren fosforipitoisuuden takia ruokinnan fosforipitoisuus ylittää usein lypsylehmän fosforin tarpeen, joten vaihtoehtoisten, vähemmän fosforia sisältävien valkuaisrehujen tutkiminen on tarpeellista (Huhtanen ym. 2009). Härkäpavun siemen on potentiaalinen kotimainen lypsylehmien valkuaisrehu, jonka avulla voidaan myös parantaa Suomen valkuaisomavaraisuutta (Puhakka ym. 2016). Sen raakavalkuaispitoisuus on 270–320 g/kg ka (Crépon ym. 2010) ja fosforipitoisuus 5,7 g/kg ka (Luke 2018) eli pienemmät kuin rypsin. Härkäpavulla voidaan mahdollisesti korvata rypsiä osittain, mutta se ei ole rypsin veroinen valkuaisrehu (Puhakka ym. 2016). Härkäpavun aminohappokoostumus ei ole yhtä tasapainoinen kuin rypsin, vaan härkäpavussa on mm. pienempi metioniinipitoisuus (Luke 2018). Maidontuotantoa yleensä ensimmäisenä rajoittavia aminohappoja ovat metioniini, lysiini (Robinson 2010) ja Suomessa nurmisäilörehu-viljaruokinnalla histidiini (Vanhatalo, 1999). Crépon ym. (2010) mukaan härkäpavun suuri valkuais- ja energiapitoisuus tekee siitä hyvän rehukasvin. Härkäpavun valkuaisen pötsihojovuus on kuitenkin suurempi kuin rypsin (Luke 2018), jolloin valkuaisen hyväksikäyttö heikkenee.

Uusia valkuaislähteitä on etsitty viime vuosikymmeninä, ja yksisoluiset eliöt (sienet, hiiuvat, mikrolevät ja bakteerit) ovat yksi vaihtoehto. Mikrolevistä spirulina sisältää valkuaista noin 700 g/kg ka (Lamminen ym. 2017) ja fosforia 7,03-8,03 g/kg ka (Tokusoglu ja Ünäl 2003). Spirulinan fosfori:raakavalkuaisuhde on pienempi kuin rypsin ja härkäpavun. Suuremman raakavalkuaispitoisuuden ansiosta sen syöttömäärä on pienempi, jolloin

ruokinnan fosforipitoisuus voi pienentyä. Kuitenkin spirulinan histidiinipitoisuus on rypsiä (Lamminen ym. 2017) ja härkäpapua pienempi (Luke 2018). Toisaalta spiruliinan metioniipitoisuus (Lamminen ym. 2017) on suurempi kuin härkäpavun (Luke 2018). Spirulina voi aiheuttaa rehun maittavuusongelmia, jolloin kuiva-aineen syönti voi pienentyä (Lamminen ym. 2017). Spirulinaa ja muita mikroleviä on tutkittu vielä vähän lypsylehmien rehuna. Mikrolevien valkuaissato (4 000 – 15 000 kg/ha) on huomattavasti suurempi kuin härkäpavun (1 000 – 2 000 kg/ha) tai rypsin (750 kg/ha) (van Krimpen ym. 2013), joten senkin vuoksi niiden mahdollisuuksia lypsylehmien rehuna on hyödyllistä tutkia lisää.

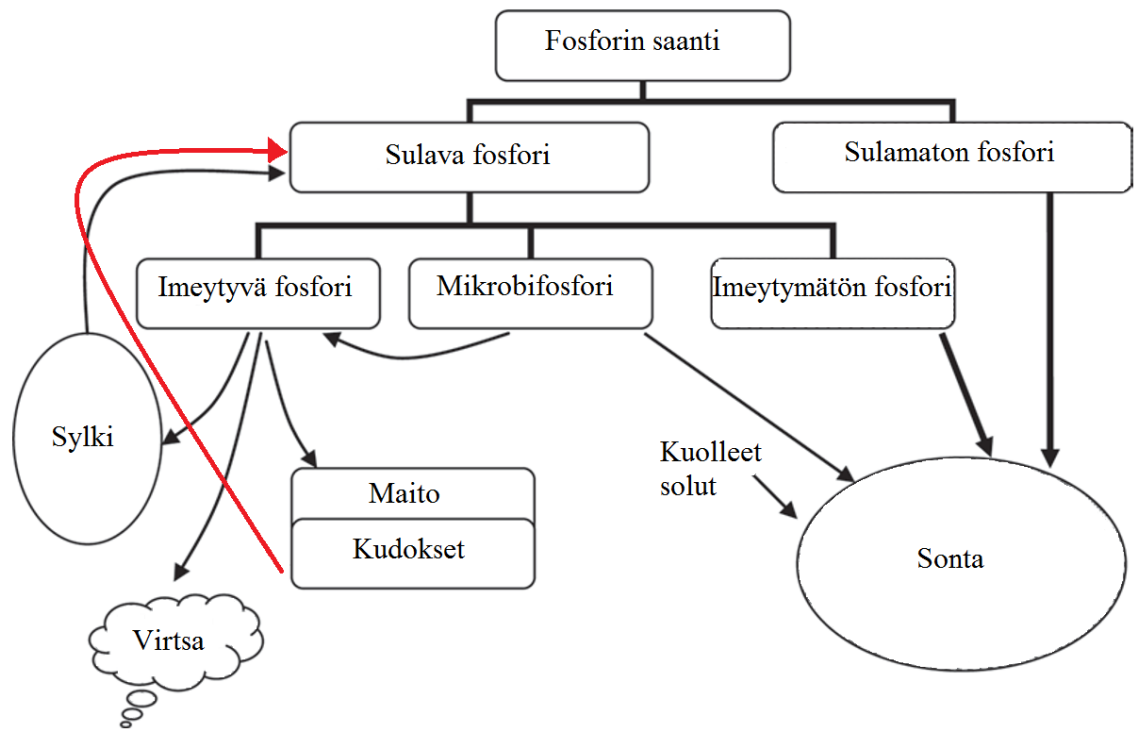
4 Fosfori

4.1 Märehtijöiden fosforin aineenvaihdunta

Fosfori on eläimissä toiseksi yleisin mineraali kalsiumin jälkeen (Suttle 2010). Fosforin tärkein tehtävä on olla luuston ja hampaiden rakennusaine yhdessä kalsiumin kanssa (Suttle 2010). Fosforista 80 % on sitoutuneena luustoon ja hampaisiin (Suttle 2010). Luusto toimii myös fosforin varastona, jota voidaan käyttää, kun fosforin saanti ravinnosta on tarpeeseen nähden liian pientä (Puggaard ym. 2014). Fosfori on osallisena myös useissa kehon eri toiminnoissa, kuten hermoston toiminnassa, solukalvojen synteessissä ja se osallistuu myös energia-aineenvaihduntaan adenosiinitrifosfaatin (ATP) muodossa (Suttle 2010). Luuston ja hampaiden lisäksi fosforia esiintyy kehon nesteissä ja pehmytkudoksissa (Suttle 2010).

Fosforin aineenvaihdunta lehmässä on esitetty kuvassa 1 (Dou ym. 2007). Fosforista osa on sulavaa ja osa sulamatonta. Sulavasta fosforista osa imeytyy suoraan lehmän käyttöön, osa hyödynnetään pötsimikrobien kasvuun ja osa päätyy sонтаan. Mikrobifosfori on lehmälle hyödynnettävissä pötsin jälkeen. Fosfori imeytyy ruoansulatuskanavassa epäorgaanisessa muodossa (Humer ja Zebeli 2015). Imeytynyttä fosforia voidaan hyödyntää kudoksissa, käyttää maidontuotantoon ja osa kiertää syljen mukana takaisin pötsiin. Kudoksista voi vapautua fosforia uudelleen käytettäväksi. Esimerkiksi luiden mineraalimobiliisaatiota tapahtuu koko ajan (Knowlton ja Herbein 2002). Varsinkin alkutuotoskauden ai-

kana ruokinnan pieni kalsiumpitoisuus lisää luiden mobilisaatiota, jolloin lehmä voi hyödyntää endogeenistä fosforia enemmän (Elizondo Salazar ym. 2013). Pieni osa imeytyneestä fosforista päätyy virtsaan. Sontaan päätyy kaikki sulamaton fosfori, ohutsuolesta imeytymätön ja sen jälkeen muodostunut kuolleiden solujen sisältämä fosfori ja mikrobifosfori.



Kuva 1. Fosforin aineenvaihdunta lehmässä (mukaillen Dou ym. 2007). Alkuperäinen kieli englanti. Lupa kuvan käyttöön saatu Zhengxia Doultä sähköpostitse. Punainen nuoli on lisäys alkuperäiseen kuvaan.

Sylki on tärkeä osa lehmän sisäistä fosforikiertoa (Morse ym. 1992b, Suttle 2010). Ruokinnan fosforipitoisuus vaikuttaa plasman fosforipitoisuuteen (Morse ym. 1992b, Valk ym. 2002, Puggaard ym. 2014), joka puolestaan vaikuttaa syljen fosforipitoisuuteen (Valk ym. 2002). Ruokinnan fosforipitoisuudesta riippuen, syljen fosforipitoisuus vaihtelee välillä 4,3-12,1 mmol/l ja plasman välillä 0,8-2,4 mmol/l (Valk ym. 2002). Puggaardin ym (2014) mukaan plasman fosforipitoisuus vaihtelee myös tuotoskauden mukaan. Syljen määrä ja sen fosforipitoisuus vaikuttavat rehun syöntiin ja endogeenisen fosforin osuuteen sonnassa (Valk ym. 2002). Pötsin fosforista jopa puolet voi olla peräisin syljestä

(Kincaid ja Rodehutsord 2005). Ruokinta siis vaikuttaa pötsin fosforipitoisuuteen kahdella tapaa: suoraan syödyn rehun ja syljen mukana tulevan fosforin kautta.

4.2 Lypsylehmän fosforin tarve

Fosforin tarpeeseen vaikuttavat mm. lehmän maitotuotos ja elopaino. Fosforin saantisuositukset lypsylehmälle on esitetty taulukossa 1 (NRC 2001, Luke 2018). Valk ja Šebek (1999) määrittivät 2,8 g/kg ka fosforia ruokinnassa olevan riittävä lypsylehmälle, joka tuottaa maitoa 9000 kg/tuotokausi. Puggaardin ym. (2014) mukaan ruokinnan fosforipitoisuuden alaraja on 2,8 g/kg ka, jolloin n. 33 kg/pv lypsävän lehmän terveys ja tuotos eivät kärsi liian pienestä ruokinnan fosforipitoisuudesta. Eräissä tutkimuksissa ruokinnan fosforipitoisuuden ollessa 2,4 g/kg ka (Valk ja Šebek, 1999) tai 2,2 g/kg ka (Puggaard ym. 2014), lehmien kuiva-aineen syönti ja maitotuotos pienenevät. Puggaardin ym. (2014) tutkimuksessa pienimmällä ruokinnan fosforipitoisuudella lehmillä esiintyi myös useita terveysongelmia (mm. ketoosi, juoksutusmahan kiertymä).

Taulukko 1. Fosforin saantisuositukset lypsylehmälle, jonka elopaino on 550 kg (Luke, 2018) tai 680 kg (NRC, 2001).

	Maitotuotos kg/pv			
	25	35	45	55
Fosforin saanti g/pv				
Luke	58	77	97	116
NRC	65	83	97	114
Ruokinnan fosforipitoisuus g/kg ka				
NRC	3,2	3,5	3,6	3,8
Sulavan fosforin saanti g/pv				
NRC	44	57	69	80

Kincaidin ja Rodehutsordin (2005) mukaan lypsylehmän fosforin tarve on suureksi osaksi pötsimikrobien fosforin tarvetta. Heidän mukaansa mikrobit tarvitsevat fosforia muun muassa ATP:n, fosfolipidien ja nukleotidien valmistukseen. Jos mikrobien fosforin tarve ei täyty, seurauksena voi olla mikrobien valkuaissynteesin ja pötsifermentaation häiriintyminen sekä orgaanisen aineen sulavuuden pienentyminen (Kincaid ja Rodehutsord 2005). Fosforin puutoksen vaikutus hiilihydraattien sulavuuteen on epäselvä

(Kincaid ja Rodehutsord 2005), mutta Durandin ja Komisarczukun (1988) mukaan alhainen fosforin saanti häiritsee sellulolyyttisten mikrobien toimintaa ja vähentää niiden aktiivisuutta. Puggaardin ym. (2014) tutkimuksessa kuiva-aineen syönti pieneni, kun ruokinta sisälsi 2,3 g/kg ka fosforia, mutta kuiva-aineen syönnissä ei ollut eroa, kun ruokinta sisälsi 2,8-3,3 g/kg ka fosforia. Valkin ja Šebekin (1999) kahden vuoden tutkimuksessa kuiva-aineen syönnin havaittiin pienentyvän vasta ensimmäisen tuotoskauden jälkeen, kun ruokinnan fosforipitoisuus oli 2,4 g/kg ka. Puggaard ym. (2011) eivät kuitenkaan havainneet kuiva-aineen syönnissä eroja, kun ruokinta sisälsi 2,4-3,4 g/kg ka fosforia, mutta neutraalidetergenttikuidun (NDF) näennäinen sulavuus pieneni ruokinnan fosforipitoisuuden pienentyessä. Luiden mineraalimobilisaatiota tapahtuu riippumatta siitä, saadaanko fosforia tarpeeksi ruokinnasta (Knowlton ja Herbein 2002), jolloin lehmä voi hyväksikäyttää myös luustosta vapautuvaa fosforia. Siksi lyhyissä tutkimuksissa ei välttämättä havaita ruokinnan pienen fosforipitoisuuden vaikutuksia.

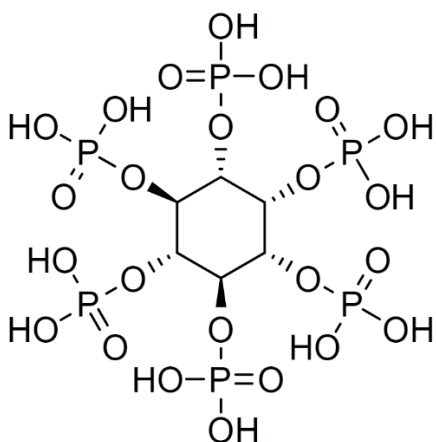
Useiden tutkimusten mukaan ruokinnan fosforipitoisuus ei vaikuta maitotuotokseen (Tallam ym. 2005, Puggaard ym. 2011, Wang ym. 2014) eikä maidon valkuais- tai rasvapitoisuuteen (Tallam ym. 2005, Elizondo Salazar ym. 2013). Samoin on todettu Klopın ym. (2013) meta-analyysissä, jossa oli 19 tutkimusta liittyen maitotuotokseen. Tutkimuksissa ruokintojen fosforipitoisuudet olivat 2,4-5,7 g/kg ka. Useimmissa tutkimuksissa ruokinnan fosforipitoisuutta säädeltiin kalsiumfosfaatin, mononatrium fosfaatin tai vastaavan avulla, jolloin ruokinnan muu koostumus pysyi samana (mm. Tallam ym. 2005, Puggaard ym. 2011, Wang ym. 2014). Wangin ym. (2014) tutkimuksessa tuotoskauden lopussa maitotuotos oli suurempi, kun ruokinnan fosforipitoisuus oli 3,7 g/kg ka verrattuna ruokintoihin, jossa fosforipitoisuus 4,7 ja 5,7 g/kg ka. Heidän tutkimuksessaan ruokinnan fosforipitoisuus ei vaikuttanut koko lypsykauden keskituotokseen. Puggaardin ym. (2011) tutkimuksessa ei havaittu negatiivisia tuotosvaikutuksia, vaikka yhden ruokinnan fosforipitoisuus oli 2,4 g/kg ka eli alle NRC:n suositteleman (taulukko 2) n. 30 kg/pv tuotostasolla. Usein ruokintatutkimukset ovat kuitenkin varsin lyhytkestoisia (Puggaard ym. 2014). Reidin ym. (2015) mukaan lyhyt tutkimusaika voi vaikuttaa siihen, ettei negatiivisia vaikutuksia ehditä havaita niillä ruokinnoilla, joissa fosforipitoisuus on pieni. Kuitenkin Ferrisin ym. (2010) tutkimus kesti 4 lypsykauden ajan, eivätkä he havainneet ruokinnan fosforipitoisuuden vaikuttavan maitotuotokseen, mutta heidän tutkimuksessaan ruokintojen fosforipitoisuudet olivat vähintään NRC:n suosituksen mukaisia.

Knowltonin ym. (2004) mukaan uskomus siitä, että ylimääräinen fosfori parantaa lehmien lisääntymiskykyä, on yksi syy liiallisen fosforin syöttämiseen. Useiden tutkimusten mukaan (mm. Tallam ym. 2005, Bjelland ym. 2011, Wang ym. 2014) ruokinnan fosforipitoisuudella (3,0-5,7 g/kg ka) ei kuitenkaan ole vaikutusta lehmien lisääntymiskykyyn. Bjellandin ym. (2011) mukaan ylimääräisen (yli NRC:n suosituksen) fosforin syöttäminen hiehoille ei paranna niiden lisääntymiskykyä tai maitotuotosta. Tallam ym. (2005) eivät havainneet ruokinnan fosforipitoisuuden vaikuttavan lehmien munasarjojen toimintaan tai lisääntymiskykyyn, kun ruokinnan fosforipitoisuus oli 3,7-5,7 g/kg ka.

Rehuista saadun fosforin näennäinen kokonaissulavuus vaihtelee. Fosforin näennäinen sulavuus lisääntyy, kun sen saanti pienenee (Wu ja Satter 2000, Valk ym. 2002, Ekelund ym. 2005, Puggaard ym. 2011). Väitettä tukee Knowltonin ja Herbeinin (2002) tutkimustulos, jossa fosforin näennäinen sulavuus oli 494 g/kg, kun ruokinta sisälsi 3,4 g/kg ka fosforia ja n. 328 g/kg, kun fosforia oli 6,7 g/kg ka. Suurin osa kasvien fosforista ei ole epäorgaanisessa muodossa, vaan sitoutuneena orgaanisessa muodossa fytaattifosforiin (Suttle 2010) (kuva 2). Fytaattifosfori eli fytiini sisältää fytiinihappoa ja sen suoloja (Kincaid ja Rodehutsord 2005). Rypsirouheen fosforista 77 %, härkäpavun 79 % (Kyntäjä ym. 2014) ja spirulinan 74 % (Boney ja Moritz, 2017) on fytaattifosforia. Fytaattifosfori on märehtijöille helpommin käytettävissä kuin yksimahaisille (Humer ja Zebeli 2015). Pötsimikrobit pystyvät vapauttamaan fytaattifosforin sisältämän fosforin lähes täydellisesti (Morse ym. 1992a). Fosfori vapautuu fytaattifosforista fytaasientsyymien avulla hydrolyysin kautta (Kincaid ja Rodehutsord 2005, Humer ja Zebeli 2015). Eniten fytaasientsyymiä tuottavat ne bakteerit, jotka fermentoivat myös tärkkelystä (Kincaid ja Rodehutsord 2005). Fytaasientsyymi voi olla peräisin myös kasvista itsestään (Kincaid ja Rodehutsord 2005), mutta kasviperäisen fytaasin vaikutus fosforin sulavuuteen on vielä epäselvä (Jarrett ym. 2014). Rypsi ja härkäpapu sisältävät hyvin vähän luontaista fytaasientsyymiä (Kyntäjä ym. 2014).

Fytaattifosfori ei yleensä rajoita lehmän fosforin saantia (Morse ym. 1992a), mutta Kincaidin ym. (2005) tutkimuksessa saatiin viiteitä siitä, että fytaattifosfori ei aina sula täydellisesti pötsissä ja joitakin rehuja käytettäessä fytaasientsyymillisä voi parantaa fosforin sulavuutta. Kincaidin ym. (2005) mukaan fytaasientsyymillisellä ei ollut vaikutusta maitotuotokseen tai kuiva-aineen syöntiin, mutta se pienensi sonnan fosforipitoisuutta. Jar-

rettin ym. (2014) tutkimuksen mukaan fytaasientsyymilisiä paransi fytaattifosforin sulavuutta vain vähän (967 vs. 976 g/kg), mutta se ei vaikuttanut kokonaisfosforin sulavuuteen. Fytaaasientsyymien vaikutus alkaa nopeasti, kun se lisätään rehuun, joten fytaattifosforin pitoisuuden oletettiin olevan sama niissä koeruokkinnoissa, joihin lisättiin fytaaasientsyymiä ja joihin ei lisätty (Jarrett ym. 2014). Fytaattifosforin sulavuus voi pienentyä, kun kuiva-aineen syönti lisääntyy, jolloin rehun viipymäaika pötsissä pienenee (Humer ja Zebeli 2015) ja rehun altistusaika mikrobien tuottamalle fytaaasientsyymille lyhenee (Jarrett ym. 2014, Humer ja Zebeli 2015).



Kuva 2. Fytiinihapon kemiallinen rakennekaava. kuva julkaistu tekijänoikeudettomana (Public Domain Mark).

4.3 Fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa ja erityis virtsaan ja sontaan

Fosfori poistuu lehmästä pääasiassa sonnan ja maidon mukana (Suttle 2010). Maidon fosforipitoisuus on noin 0,66-1,10 g/kg (Klop ym. 2013). Fosforin saanti ei vaikuta juurikaan maidon fosforipitoisuuteen (Morse ym. 1992b, Valk ym. 2002, Klop ym. 2013). Klop ym. (2013) mukaan esimerkiksi ruokinnan koostumus, vuoden aika ja tuotoskauden vaihe voivat vaikuttaa maidon fosforipitoisuuteen, ei niinkään ruokinnan fosforipitoisuus. Maidossa eritetyn fosforin osuus fosforin saannista eli fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa heikkenee, kun ruokinnan fosforipitoisuus suurenee (Morse ym. 1992b, Knowlton ja Herbein 2002, Klop ym. 2013), varsinkin jos fosforin saanti ylittää lehmän fosforin tarpeen (Morse ym. 1992b). Eli fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa voidaan tehostaa, kun lehmän fosforin saantia pienennetään (Bannink ym. 2010). Knowltonin ja

Herbeinin (2002) tutkimuksessa fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa oli n. 54 %, 33 % ja 26 % riippuen ruokinnan fosforipitoisuudesta (taulukko 2). Heidän tutkimuksensa pienin ruokinnan fosforipitoisuus (3,4 g/kg ka) oli pieni verrattuna lehmien tuotostasoon (keskimäärin 47,9 kg/pv), jonka vuoksi todennäköisesti fosforin hyväksikäyttö oli erityisen tehokasta.

Fosforin saanti vaikuttaa sen eritykseen sonnassa (Morse ym. 1992b, Valk ym. 2002) (taulukko 2). Ruokinnan fosforipitoisuuden lisääntyessä myös sonnan fosforipitoisuus lisääntyy (Tallam ym. 2005, Wang ym. 2014). Valkin ym. (2002) tutkimuksessa sonnassa eritetyn fosforin määrä pieneni 35 %, kun ruokinnan fosforipitoisuus pieneni 3,3 g/kg ka pitoisuudesta 2,8 g/kg ka pitoisuuteen. Tallamin ym. (2005) tutkimuksessa sonnan fosforipitoisuus pieneni 29 %, kun ruokinnan fosforipitoisuus pieneni 1,2 g/kg ka. Liukoisen fosforin osuus sonnan kokonaisfosforista lisääntyy, kun sonnan fosforipitoisuus lisääntyy (Dou ym. 2010, Chapuis-Lardy ym. 2004). Doun ym. (2010) mukaan sonnan fosforipitoisuus voi olla suuri myös silloin kun ruokinnan fosforipitoisuus on kohtuullinen. Tällöin todennäköisesti lehmän maitotuotos on pieni ja fosforia ei sitoudu maitotuotokseen, vaan ylimääräinen poistuu sonnan mukana. Maitotuotoksen lisääntyminen vähentää fosforin pitoisuutta sonnassa ja parantaa näennäistä sulavuutta (Valk ym. 2002).

Fosforia poistuu niukasti munuaisten kautta virtsaan (Horst 1986) eli virtsa sisältää hyvin vähän fosforia (Elizondo Salazar ym. 2013, Wang ym. 2014). Elizondo Salazar ym. (2013) havaitsivat, että virtsan fosforipitoisuus vaihtelee paljon (7,5-23,4 mg/l) ja ruokinnan fosforipitoisuuden vaikutus siihen on epäselvä. Virtsan fosforipitoisuuden (Wang ym. 2014) tai virtsassa eritetyn fosforin määrän (Puggaard ym. 2011) on havaittu lisääntyvän lineaarisesti, kun ruokinnan fosforipitoisuus lisääntyy. Toisissa tutkimuksissa ruokinnan fosforipitoisuus ei ole vaikuttanut virtsassa eritetyn fosforin määrään (Ferris ym. 2010, Puggaard ym. 2014). Virtsan fosforipitoisuus (Ekelund ym. 2005) ja fosforin eritysmäärä virtsassa (Ferris ym. 2010) voivat lisääntyä, jos ruokinta sisältää hyvin suuria määriä fosforia. Ekelundin ym. (2005) tutkimuksessa virtsan fosforipitoisuus lisääntyi selvästi, kun ruokinnan fosforipitoisuus oli 6,4-7,8 g/kg ka. Myös geneettisen perimän on arveltu vaikuttavan fosforin pitoisuuteen virtsassa (Løvendahl ja Sehested 2016).

Taulukko 2. Ruokinnan fosforipitoisuuden vaikutukset

Viite	Ruokinnan P-pit., g/kg ka	P sula- vuus, g/kg	Ka:n syönti, kg/pv	Maito- tuotos, kg/pv ¹	Sonnan fosfori		
					P-pit., g/kg ka	P-eritys, g/pv	P-pit., erotus % ²
A	3,4	494	25,3	49,5	5,72	42,3	61
	5,1	344	26,6	48,4	10,5	87,5	
	6,7	328	24,1	45,8	14,8	108,6	
B	2,4	369	17,6	23±4	4 - 23	27,7	83
	3,7	284	17,7			47,2	
	5,1	220	17,8			71,7	
	6,4	209	17,9			92,4	
	7,8	217	18,0			111,0	
C	3,5		20,7	40,5	6,3		29
	4,7		21	39,0	8,9		
D	3,5	413	20,8	36,4	6,2	47,5	26
	4,2	397	22,0	35,4	8,4	52,6	
E	2,4	549	19,8	30,6		21,6	
	3,4	540	19,6	30,8		30,8	
F	3,7		22,4	21,5	6,9		40
	4,7		22,0	20,7	9,0		
	5,7		22,4	22,0	10,9		

P-pit. fosforipitoisuus, P fosfori, ka kuiva-aine

¹ Viitteissä 1 ja 3-6 ruokinnan fosforipitoisuus ei vaikuttanut maitotuotokseen. Viitteessä 2 ei raportoitu koekäsittelyiden vaikutusta maitotuotokseen.

² Sonnan fosforipitoisuuden erotus pienimmän ja suurimman ruokinnan fosforipitoisuuden välillä. Viitteet: A= Knowlton ja Herbein (2002), B= Ekelund ym. (2005), C= Tallam ym. (2005), D= Odongo ym. (2007), E= Puggaard ym. (2011), F= Wang ym. (2014)

5 Tavoitteet ja hypoteesit

Tämä tutkimus oli osa Maa- ja metsätalousministeriön Maatilatalouden kehittämisrahas-
ton (MAKERA) ja Raisioagro Oy:n rahoittamaa Kestävä tehokkuus -hanketta, jossa ta-
voitteena oli vähentää fossiilisten polttoaineiden kulutusta maidontuotannossa sekä vä-

hentää maatalouden aiheuttamia ympäristövaikutuksia. Tutkimuksessa verrattiin jauhetua härkäpapua ja rypsirouhetta lypsylehmien valkuaisrehuina. Lisäksi puolet rypsin ja härkäpavun sisältämästä raakavalkuaisesta korvattiin spirulina-mikrolevän raakavalkuaisella. Tässä maisterintutkielmassa keskitytään fosforin hyväksikäyttöön. Tavoitteena oli selvittää, voidaanko härkäpavun ja mikrolevän käytöllä vähentää fosforipäästöjä ympäristöön ja tehostaa fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa verrattuna rypsiin.

Osa kokeen tuloksista on julkaistu aiemmissa maisterintutkielmissa. Mäkisen (2016) maisterintutkielma käsitteli rypsin, härkäpavun ja spirulinan vaikutusta pötsikäymiseen, plasman energiametaboliitteihin ja maidontuotantoon. Tarsian (2016) maisterintutkielma käsitteli rypsin, härkäpavun ja spirulinan vaikutusta lypsylehmän valkuaisen hyväksikäyttöön.

Tutkimuksen hypoteeseja olivat:

1. Rypsin korvaaminen härkäpavulla pienentää maitotuotosta, johtuen härkäpavun pienemmästä metioniinipitoisuudesta ja suuremmasta pötsihajoavuudesta. Rypsirokinnoilla fosforin saanti ja erityis sontaan ovat suurempia kuin härkäpapuruokinnoilla, koska rypsi sisältää enemmän fosforia kuin härkäpapu.
2. Perusvalkuaisrehun osittainen korvaaminen spirulinalla pienentää kuiva-aineen syöntiä johtuen spirulinan huonosta maittavuudesta. Myös fosforin saanti pienenee, koska spirulinan suuren raakavalkuaispitoisuuden ansiosta sen syöttömäärä on pienempi kuin rypsin ja härkäpavun.
3. Härkäpavun osittainen korvaaminen spirulinalla suurentaa maitotuotosta, sillä spirulina täydentää härkäpavun aminohappokoostumusta varsinkin metioniinin osalta. Kun härkäpavusta korvataan osa spirulinalla, fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa tehostuu suuremman maitotuotoksen ansiosta.

6 Aineistot ja menetelmät

6.1 Koejärjestelyt ja -käsittelyt sekä rehut

Tutkimus toteutettiin Viikin opetus- ja tutkimustilan navetassa 21.2.2015 – 15.5.2015. Koeasetelma hyväksytettiin eläinkoelautakunnalla. Kokeessa noudatettiin EU:n ja Suomen lainsäädäntöä koejärjestelyiden suhteen (EU direktiivi 2010/63/EU ja kansallinen lainsäädäntö ”Laki tieteellisiin tai opetustarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta 497/2013”). Kokeessa oli mukana kahdeksan ayrshire-lehmää (taulukko 3), joista neljä oli pötsifistelöityjä. Lehmät olivat poikineet useamman kerran (2-6) ja niiden poikimisesta kokeen alkaessa oli keskimäärin 113 päivää (keskihajonta 36,3). Eläimet punnittiin sekä kokeen alussa (707 kg, keskihajonta 63,2) että lopussa (713 kg, keskihajonta 38,9) kahtena peräkkäisenä päivänä eläinvaa’alla (CV 9600 Scale, Solotop Oy, Helsinki, Suomi). Lehmien kuntoluokka oli kokeen alussa 3,20 (keskihajonta 0,306) ja kokeen lopussa 3,23 (keskihajonta 0,235) ja ne lypsivät kokeen alussa keskimäärin 34,1 kg/pv (keskihajonta 3,71 kg). Lehmät olivat kokeen ajan kytkettyinä parteen, joka oli varustettu automaattisella rehunkulutuksen seurantajärjestelmällä (RIC, Roughage Intake Control, Insentec, Hollanti).

Kokeen malli oli kaksinkertainen, tasapainotettu 4×4 latinalainen neliö (taulukko 4). Fistelöidyt lehmät olivat neliössä 2. Koemallissa oli neljä jaksoa ja jakson pituus oli 21 päivää. Näistä kaksi ensimmäistä viikkoa (päivät 1-14) olivat totutuskautta ja kolmas viikko (päivät 15-21) keruukausi. Koeasetelma oli 2×2 faktoriaalinen, tutkittavina tekijöinä oli väkirehun valkuaisäydennyksen raaka-aineet. Koeruokinnat olivat seosrehua ja niitä oli neljä. Ensimmäisessä koeruokinnassa (R) valkuaislähteenä oli rypsirouhe (Raimix rypsi, Raisioagro Oy) ja toisessa (RSP) rypsirouheen valkuaisesta puolet korvattiin *Spirulina platensis* -mikrolevän (Duplaco B. V., Hengalo, Hollanti) valkuaisella. Kolmannessa (HP) koeruokinnassa valkuaislähteenä oli jauhettu härkäpapu, ja neljännessä (HPSP) puolet härkäpavun valkuaisesta korvattiin spirulina-mikrolevän valkuaisella. Koeruokinnat olivat isonitrogeenisia valkuaisrehusta saatavan valkuaisrehun suhteen. Valkuaisrehun lisäksi seosrehu sisälsi jauhettua ohraa, melassileikettä (Raimix leike, Raisioagro Oy, Raisio, Suomi) ja kivennäisseosta (Seleeni-E-Melli TMR-kivennäinen, Raisioagro Oy). Härkäpapu ja ohra oli kasvatettu Viikin opetus- ja tutkimustilalla ja jauhettu

valssimyllyllä. Ohran osuutta muuttamalla väkirehun osuus seosrehusta säilyi vakiona. Seosrehun karkearehu:väkirehu -suhde kuiva-aineessa oli 55:45 (taulukko 5).

Taulukko 3. Kokeen lehmät

Neliö 1				
Nro	Korvanro	Nimi	Poikimakerta	Poikimapäivä
1	630	Enya	3	1.10.14
2	651	Hösselix	3	21.10.14
3	699	Iconessa	2	30.10.14
4	688	Ilopilleri	2	6.11.14
Neliö 2				
Nro	Korvanro	Nimi	Poikimakerta	Poikimapäivä
5	591	Avenue	5	7.1.15
6	587	Ahaa	5	26.10.14
7	549	Yabonita	5	7.9.14
8	560	Ässämix	6	25.11.14

Taulukko 4. Koeruokinnat lehmäkohtaisesti

Jakso	Aika	Neliö				Neliö			
		1				2			
		Lehmän numero							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	21.2.-13.3.	R	RSP	HP	HPSP	R	RSP	HP	HPSP
2	14.3.-2.4.	RSP	HP	HPSP	R	RSP	HP	HPSP	R
3	4.4.-24.4.	HP	R	RSP	HP	HP	R	RSP	HP
4	25.4.15.5.	HPSP	HPSP	R	RSP	HPSP	HPSP	R	RSP

R= perusvalkuaisrehuna rypsi, RSP= perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen), HP= perusvalkuaisrehuna härkäpapu, HPSP= perusvalkuaisrehuna härkäpavun ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

Taulukko 5. Seosrehun koostumus eri koeruokkinnoilla

	Koeruokinnat ¹			
	R	RSP	HP	HPSP
Osuus ka:sta, %				
Säilörehu	55,0	55,0	55,0	55,0
Spirulina	0,00	2,70	0,00	2,70
Rypsirouhe	9,90	5,00	0,00	0,00
Härkäpapu	0,00	0,00	12,2	6,10
Ohra	27,2	29,4	24,8	28,2
Melassileike	6,80	6,80	6,80	6,80
Kivennäinen	1,20	1,20	1,20	1,20
Väkirehut yht.	45,0	45,0	45,0	45,0
Ruokinnassa, g/kg ka				
Orgaaninen aine	910	912	914	914
NDF	395	381	373	370
Tärkkelys	184	196	208	208
Raakavalkuainen	165	169	166	170
ME, MJ/kg ka	11,5	11,5	11,7	11,6
Fosfori	3,93	3,90	3,75	3,76
VO (%)	20,7	21,1	22,8	22,0

NDF neutraalidetergenttikuitu, ME muuntokelpoinen energia, VO valkuaisrehusta saatavan valkuaisen osuus

¹ R= perusvalkuaisrehuna rypsi, RSP= perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen), HP= perusvalkuaisrehuna härkäpapu, HPSP= perusvalkuaisrehuna härkäpavun ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

Seosrehun nurmisäilörehu oli toisen sadon esikuivattua timotei-nurminata (*Phleum pratense-Festuca pratensis*) -rehua. Rehu korjattiin pyöröpaaleihin (Welger Profi RP-235, Welger Maschinenfabrik GmbH, Wolfenbüttel, Saksa) 22.7.2014 Koirasuon peltolohkolta Viikin opetus- ja tutkimustilalta. Säilöntäaineena käytettiin muurahaishappopohjaista valmistetta (AIV 2 Plus, Taminco Finland Oy, Oulu, Suomi) annostasolla n. 8 l/tn rehua. Säilöntäaine sisälsi muurahaishappoa 760 g/kg ja ammoniumformiaattia 55 g/kg.

Seosrehua tehtiin kolme kertaa viikossa sekoittavalla kiskoruokkijalla ja se säilöttiin kylmiössä. Säilörehupaaleja pyöritettiin mikserissä (CutMix, Pellon Group, Ylihärmä, Suomi) 20 min/paali. Pyörimisen loppuvaiheessa rehun sekaan lisättiin propionihappoa (Propion, Hankkija Oy, Hyvinkää, Suomi) 1 l/1000 kg rehua säilyvyyden varmistamiseksi ja jälkilämpenemisen estämiseksi. Propionihappo laimennettiin veteen suhteessa 1:8. Rehu kulkeutui automaattisesti kiskoruokkijaan (TMR-sukkula M2, Pellon Group,

Ylihärmä, Suomi). Väkirehu lisättiin käsin mikseristä tulevaan rehuun. Härkäpapu, rypsirohe, melassileike, ohra ja kivennäinen punnittiin etukäteen erillisen ohjeen mukaan. Ohraan sekoitettiin punnittu spiruliina ja vettä, jotta seos ei pölynnyt. Vettä sekoitettiin myös ohraan, johon ei sekoitettu spirulinaa. Seosrehua jaettiin kolme kertaa vuorokaudessa (klo 8.30, 14.00-15.00 ja 20.00). Vaakakuppien rehumäärät kirjattiin ylös joka päivä ennen rehun jakoa ja sen jälkeen. Edellisen päivän rehujäännökset poistettiin aamulla ennen ensimmäistä seosrehun jakoa. Rehukuppien tyhjennyksen yhteydessä kirjattiin ylös säilörehujäännös päivittäin. Lehmät söivät seosrehua vapaasti, sitä jaettiin vuorokaudessa yhteensä 107 % kahden edellispäivän syönnin keskiarvosta.

6.2 Näytteet ja mittaukset

6.2.1 Näytteiden otto ja mittaukset

Säilörehusta kerättiin näyte joka maanantai ja perjantai, josta määritettiin kuiva-ainepitoisuus ja pH (S20 SevenEasy™ pH, Mettler-Toledo Ltd, Greifensee, Sveitsi). Seosrehusta kerättiin 2 kg (rehuvaaka ITB 60K10DLIPM, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Saksa) näytettä keruuviikolla (pv 14-19) seoksen teon yhteydessä. Lisäksi säilörehusta kerättiin 2 kg näyte, joka pakastettiin -20 °C:ssa. Näytteet yhdistettiin rehuittain ja jaksottain ennen analyysiä. Väkirehun kaikista komponenteista kerättiin seosrehun teon yhteydessä näytteet (yhteensä 3 dl) keruuviikolla (pv 14-19). Kaikki muut komponentit esikäsiteltiin ja analysoitiin erikseen joka jaksolta, paitsi kivennäisseosnäytteet yhdistettiin yhdeksi näytteeksi koko kokeen ajalta.

Kuntoluokitus (Edmonson ym. 1989) tehtiin kokeen alussa ja lisäksi jokaisen koejakson lopussa. Lehmät lypsettiin kahdesti päivässä (klo 6.00 ja 17.00) putkilypsykoneella (Delpro, DeLaval, Tumba, Ruotsi). Maitomäärä mitattiin (WB Auto Sampler, Tru-Test, Auckland, Uusi-Seelanti) ja kirjattiin jokaisella lypsykerralla. Maitonäytteet otettiin neljänä peräkkäisenä lypsykertana keruuviikolla (pv 18-19). Maitonäyte säilöttiin Bronopol-säilöntäainepillerillä (Valio Oy, Helsinki, Suomi). Samoilta lypsykerroilta pipetoitiin suhteellinen näyte fosforimäärityksiä varten. Tämä maitonäyte säilöttiin ilman säilöntäainepilleriä pakkaseen.

Kaikilta lehmiltä kerättiin sontanäytteet spot-näytteenä (n. 500 ml/kerta) keruuviikon neljänä peräkkäisenä päivänä (pv 17-20). Näytteet kerättiin klo 7.00 ja 15.30 suoraan peräsuolesta pakasterasiaan ja pakastettiin välittömästi. Keruuajakson jälkeen lehmäkohtaiset näytteet sulatettiin ja yhdistettiin. Kaikilta lehmiltä kerättiin virtsanäytteet (vähintään 500 ml/kerta) keruuviikolla kahtena päivänä (pv 18-19). Näytteet kerättiin alkaen klo 5.30 ja 14.30 (pv 18) sekä alkaen klo 10.00 ja 19.00 (pv 19). Virtsa suodatettiin 300 ml harsokankaan läpi pulloon, joka sisälsi 15 ml rikkihappoa (H_2SO_4) pH:n laskemiseksi. Virtsanäytettä sekoitettiin ja sen pH määritettiin pH-liuskalla. Jos pH oli yli kolme, rikkihappoa lisättiin. Typpi- ja fosforianalyysyjä varten virtsasta otettiin näytteet laimentamattomana. Virtsan kreatiniinin, allantoniinin, virtsahapon ja urean pitoisuuksien mittaamista varten virtsanäytettä laimennettiin tislattulla vedellä 1:10. Näytteet säilöttiin esikäsittelyiden jälkeen pakkaseen $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

6.2.2 Näytteiden analysointi

Keruuviikolla otettujen näytteiden analysointi tapahtui Helsingin yliopiston maataloustieteiden laitoksen kotieläintieteen laboratoriossa. Kivennäisnäyte analysoitiin (menetelmä ISO 5516:1978) Eurofins viljavuuspalvelu Oy:ssä, Mikkelissä.

Primäärinen kuiva-aineen määrittämistä varten näytteet kuivattiin 20-24 h $103\text{ }^\circ\text{C}$ lämpötilassa (Memmert, Memmert GmbH, Schwabach, Saksa). Analyysinäytteitä kuivattiin ensin tunti $103\text{ }^\circ\text{C}$:ssa, ja sen jälkeen rehunäytteitä kuivattiin $50\text{ }^\circ\text{C}$:ssa ja sontanäytteitä $70\text{ }^\circ\text{C}$:ssa 48 h ajan (Memmert, Memmert GmbH). Kuivatut rehu- ja sontanäytteet jauhettiin vasaramyllyllä (sakomylly KT-3100, Koneteollisuus Oy, Helsinki, Suomi). Rehunäytteet jauhettiin 1 mm:n seulalla ja sontanäytteet 1,5 mm:n seulalla. Lisäksi kaikki näytteet iNDF-analyysiä varten jauhettiin 1 mm:n seulalla. Sekundäärinen kuiva-aine analysoitiin kuivatusta analyysinäytteestä kuivaamalla sitä lämpökaapissa $103\text{ }^\circ\text{C}$:ssa 17 h ajan. Säilörehusta määritettiin primäärinen ja sekundäärinen kuiva-aine, kokonaisfosfori, NDF, sulamaton kuitu (iNDF), pH, tuhka, *in vitro* –sellulaasisulavuus, happoon liukenematon tuhka (AIA), tärkkelys, raakavalkuainen, maitohappo, etanoli, ammoniumtyppi, VFA, pelkistävät sokerit sekä kivennäisaineet. Väkirehuista määritettiin primäärinen ja sekundäärinen kuiva-aine, kokonaisfosfori, tuhka, raakavalkuainen, NDF, AIA, iNDF, tärkkelys ja HCl-rasva. Kaikista rehuista määritettiin kivennäisaineet. Seosrehusta määritettiin primäärinen ja sekundäärinen kuiva-aine.

Tuhka määritettiin polttamalla näytettä 600 °C:ssa 20–24 h muhveliuunissa (Heraeus Thermicon T, Heraeus, Hanau, Saksa). Neutraalidetergenttikuitu määritettiin Van Soestin ym. (1991) menetelmällä, määrittelyssä käytettiin kylmä- ja kuumauuttolaitteita (Tecator Fibertec System 1020/1021, Foss, Hillerød, Tanska). NDF-pitoisuudet ilmoitettiin ilman jäännöstuhkaa ja määrittelyssä käytettiin natriumsulfiittia. Väkirehujen NDF-analyysissä käytettiin α -amylaasia. Muista rehuista, paitsi spirulinasta, määritettiin iNDF nailonpussimenetelmällä uittamalla näytteitä 12 vrk kahden lehmän pötsissä (Ahvenjärvi ym. 2000). Nailonpussin silmäkoko oli 17 μ m. Spirulinan iNDF pitoisuutta ei määritelty, koska se ei sisältänyt NDF:ää.

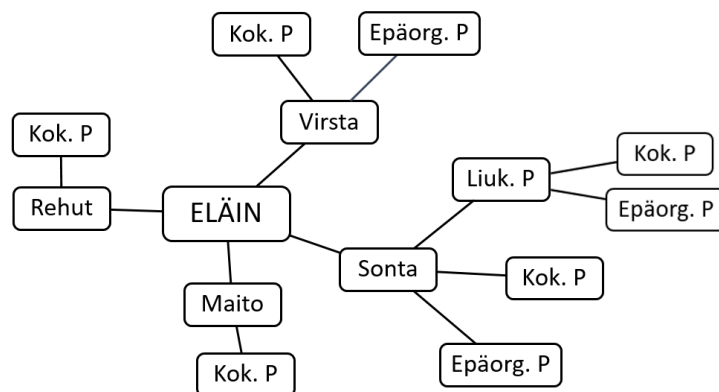
Säilörehun pH mitattiin pH-mittarilla (S20 SevenEasy™ pH, Mettler-Toledo Ltd, Leicester, Iso-Britannia). Rehujen tärkkelyspitoisuus (Salo ja Salmi 1968) sekä säilörehun maitohappopitoisuus (Barker ja Summerson 1941), ammoniakkityyppipitoisuus (McCullough 1967), vesiliukoisten hiilihydraattien pitoisuus (Somogyi 1945, Salo 1965) ja etanolipitoisuus (entsyymikitti, cat. No 176290, R-Biopharm AG, Darmstadt, Saksa) määritettiin kolorimetrisellä menetelmällä (Shimadzu UV-VIS mini 1240, Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Saksa). Happohydrolyysin avulla määritettiin AIA ja sitä käytettiin sisäisenä merkkiaineena ruokintojen näennäisen kokonaissulavuuden määrittelyssä (Van Keulen ja Young, 1977).

Säilörehun orgaanisen aineen liukoisuus määritettiin *in vitro* –sellulaasimenetelmällä (Friedel 1990) käyttäen Nousiaisen ym. (2003) muunnelmia. Tulokset muunnettiin *in vivo* –sulavuudeksi käyttämällä nurmiheinäkasvien 2. sadon korjausyhtälöä, joka perustuu suomalaisiin *in vivo* –sulavuuskokeisiin (Huhtanen ym. 2006). *In vitro* -sulavuuden avulla laskettiin orgaanisen aineen pitoisuus kuiva-aineessa (D-arvo). Rehujen raakarasvapitoisuus määritettiin petroolieetteriuutolla HCl-hydrolyysin jälkeen (FOSS Soxtec 8000 uuttoyksikkö, SoxCap 2047 hydrolyysiyksikkö, FOSS Analytical, Hillerød, Tanska).

Maidosta määritettiin peruskoostumus (rasva, laktoosi, solut, valkuainen, urea ja kuiva-aine) ja lisäksi fosfori. Maidon peruskoostumusnäytteet analysoitiin Valio Oy:n Seinäjoen aluelaboratoriossa infrapuna-analysointorilla (Milco Scan FT 6000, Foss, Hillerød, Tanska).

Taulukko 7. Nestemäisten näytteiden poltto-ohjelma

Vaihe	Max teho, wattia	Teho, %	Lämpötilan nousuaika, min	Paine, bar	Lämpötila, °C	Lämpötilan pitoaika, min
1	1600	100	10	8,3	70	20
2	1600	100	15	8,3	130	40
3	1600	100	15	8,3	150	30
Polttoaika yhteensä: 130 min + jäähtytys noin 40 min						



Kuva 3. Fosforimääritykset

Kok. P kokonaisfosfori, Epäorg. P epäorgaaninen fosfori, Liuk. P liukoinen fosfori

Märkäpoltto-ohjelman jälkeen näytteet suodatettiin tuh kattoman suodatinpaperin (Whatman 42) ja suppilon avulla happopestyihin 50 ml:n mittapulloihin. Teflon putkien huuhteluun käytettiin milli-Q vettä (Q Pod Element, Millipore Corporation, MA USA). Mittapullot täytettiin milli-Q vedellä, jolloin näytteet olivat 20 % typpihapon suhteen (10 ml HNO_3 /50 ml H_2O).

Liukoisen fosforin määrittämiseksi varten tuoretta sontanäytettä punnittiin 1g pulloon ja lisättiin 100 ml RIOS vettä. Pulloa sekoitettiin tasoravistelijalla (Infors AG CH-4103, Bottmingen, Sveitsi) 1h, sen jälkeen sentrifugoitiiin (Martin Christ, malli UJ3S, Osterode am Harz, Saksa) 3000 G 10 min ja imusuodatettiin Whatman 1 suodatinpaperin läpi.

6.3.2 Näytteiden analysointi ICP-menetelmällä

Esikäsittelyn jälkeen näytteiden fosforipitoisuus analysoitiin käyttäen induktiivisesti kytkettyä plasma-optista emissio-laitteistoa (ICP-OES, iCap6000 series, malli 6300MFC,

Thermo Scientific, Iso-Britannia). Analyysissä käytettiin V-groove sumutinkammiota. ICP-analyysimenetelmän asetukset ovat esitetty taulukossa 8.

Fosforianalyyseissä käytetyt aallonpituudet ja niiden mittaussuunta (akσιαalisuus tai radi-aalisuus) ovat ilmoitettu taulukossa 8. Aallonpituuksien määritystarkkuus tarkistettiin käyttäen ulkoista fosforistandardikäyrää, jossa konsentraatiotasoja oli viisi (0,01-1,00 mg/l). Fosforin standardiliuokset valmistettiin laimentamalla alkuperäinen standardi (10 000 mg/l, AccuStandard, New Haven, USA) 20 % typpihappoon. Fosforianalyysin virheettömyys ja tarkkuus testattiin käyttäen standardisoitua heinäreferenssijauhetta (BCR-129, Joint Research Centre of European Commission, Brysseli, Belgia) jokaisessa analyysierässä. Standardoitu fosforipitoisuus oli 2,36 g/kg (keskihajonta 0,07 g/kg) ja nyt tehdyn kokeen analysoitu fosforipitoisuus 2,30 g/kg (keskihajonta 0,229 g/kg). Fosforianalyysien saanto oli 97,5 % sertifioituun pitoisuuteen verrattuna.

Taulukko 8. ICP-analyysimenetelmän asetukset

Parametri	Arvo
Huuhtelupumpun nopeus	50 rpm
Näytteenottopumpun nopeus	50 rpm
RF-teho	1150 W
Sumutinkaasun virtausnopeus	0,65 L/min
Kantokaasun virtausnopeus	0,5 L/min
Maksimi integraatioaika	30 s
Fosforimittauksen aallonpituudet	177,495 nm (akσιαalinen mittaus)
	185,942 nm (akσιαalinen mittaus)
Laitevalmistajan ilmoittama fosforin määritysraja	0,5 (μg/L)

Epäorgaanisen fosforin pitoisuus analysoitiin molybdeenisinimenetelmällä käsittelemättömästä sonnasta, sonnan vesiliukoisesta fraktiosta ja virtsasta. Ennen epäorgaanisen fosforin analysointia, käsittelemättömät sontanäytteet esikäsiteltiin tuhkaamalla. Hienoksi jauhettua näytettä punnittiin 2 g happopestyyn upokkaaseen ja tuhkattiin 4 h ajan 560 °C lämpötilassa. Tuhkan jäähtyttyä siihen lisättiin 2 ml väkevää suolahappoa, joka haihdutettiin vesihauteessa kuivaksi. Tuhka liotettiin 2,5 ml:aan 2,5M HCL:a. Liuos suodatettiin 50 ml:n mittapulloon ja täytettiin RIOS-vedellä.

Ferrosulfaattiammoniummolybdaattiliuos valmistettiin molybdeenisinimenetelmää varten seuraavasti: Ensin valmistettiin 10 % ammoniummolybdaattivarastoliuos punnitsemalla 50 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ 500 ml:n mittapulloon ja täyttämällä 10 N rikkihapolla. Tämän jälkeen 50 ml:n mittapulloon pipetoitiin 5 ml ammoniummolybdaattivarastoliuosta ja se täytettiin noin puolilleen RIOS-vedellä. Pulloon punnittiin 2,5 g ferrosulfaattia ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$) ja ravistettiin, kunnes kiteet olivat liuenneet. Pullo täytettiin loppuun RIOS-vedellä ja suodatettiin Whatman 4 suodatinpaperin läpi.

Sonnan ja virtsan epäorgaanisen fosforin analysointia varten näytettä mitattiin koeputkiin 3 ml (virtsa), 0,05 ml (käsittelemättömän sonnan tuhattu happoliuos) tai 2,0 ml (sonnan vesiliukoinen fraktio) ja lisättiin RIOS-vettä siten, että nesteen yhteistilavuus oli aina 3,0 ml (taulukko 9).

Analyysiä varten valmistettiin standardisuora seuraavasti: Ensin valmistettiin perusliuos (fosforistandardiliuos) (1 mg P/ml) punnitsemalla 4,39 g KH_2PO_4 ja sekoittamalla se 1000 ml:aan RIOS-vettä. Tämän jälkeen perusliuosta mitattiin 100 ml mittapulloihin 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ml ja mittapullot täytettiin RIOS-vedellä. Näistä standardiliuoksista mitattiin koeputkiin 0,2 ml ja lisättiin RIOS-vettä 2,8 ml. Tällöin standardisuoran lopulliset konsentraatiot olivat 0,001; 0,003; 0,004; 0,005; 0,007; 0,008; 0,009 ja 0,011 mg P/ml.

Kaikkiin koeputkiin (näytteet ja standardisuora) lisättiin 2 ml ferrosulfaattiammoniummolybdaattiliuosta, sekoitettiin ja seisotettiin 15 min ennen mittausta. Tällöin muodostui sininen väri indikoiden epäorgaanisen fosforin konsentraatiota. Epäorgaanisen fosforin pitoisuus mitattiin spektrofotometrillä (Shimadzu UV-VIS mini 1240) molybdeenisinimenetelmällä käyttäen aallonpituutta 690 nm.

Taulukko 9. Näytemäärät epäorgaanisen fosforin määrittämisessä

Näytetyyppi	Näytemäärä	Huomiot
Virtsa	3 ml + 0 ml RIOS- H_2O	Virtsa-vesiseos sekoitettu ja fuugattu 3200 rpm/ 5min
Sonta (esikäsitelty tuhkaamalla)	0,05 ml + 2,95 ml RIOS- H_2O	
Sonnan vesiliukoinen fraktio	2 ml + 1 ml RIOS- H_2O	

6.4 Tulosten laskenta ja tilastollinen analyysi

Tulosten laskennassa käytettiin keruuviikon (pv 15-21) tuloksia. Rehujen orgaanisen aineen pitoisuus laskettiin vähentämällä kuiva-aineesta tuhkan määrä. D-arvo laskettiin kertomalla orgaanisen aineen pitoisuus orgaanisen aineen sulavuudella ja sen perusteella ME-arvo Luken (2018) mukaan. Säilörehun kuiva-ainepitoisuus korjattiin Huidan ym. (1986) mukaan. Säilörehun syönti-indeksi määritettiin Huhtasen ym. (2007) mukaan. Kuiva-aineen syönti laskettiin annetun rehun ja rehujäännöksen erotuksena. Rehujen raakavalkuaispitoisuus saatiin kertomalla kokonaistypen pitoisuus kertoimella 6,25. Orgaanisen fosforin määrä saatiin vähentämällä kokonaisfosforista (ICP:llä määritetty) epäorgaanisen fosforin (spektrofotometrillä määritetty) määrä.

Energiakorjattu maitotuotos (EKM) laskettiin Sjaunjan ym. (1990) mukaan.

$$\text{EKM (kg)} = \text{maitotuotos} \times (38,3 \times \text{rasvapitoisuus} + 24,2 \times \text{valkuaispitoisuus} + 16,54 \times \text{laktoosipitoisuus} + 20,7) / 3140.$$

Kuiva-aineen näennäinen sulavuus laskettiin kaavalla:

$$\text{Kuiva-aineen sulavuus (g/kg)} = 1 - ((\text{AIA} - \text{pitoisuus rehussa}) / (\text{AIA} - \text{pitoisuus sonnassa}))$$

Ravintoaineiden näennäinen sulavuus laskettiin kaavalla:

$$\text{Ravintoaineiden näennäinen sulavuus (g/kg)} = 1 - [((\text{AIA} - \text{pitoisuus rehussa}) / (\text{AIA} - \text{pitoisuus sonnassa})) \times ((\text{ravintoaineiden pitoisuus sonnassa}) / (\text{ravintoaineen pitoisuus rehussa}))]$$

Virtsan kokonaismäärä arvioitiin spot-näytteistä virtsan kreatiniinipitoisuuden avulla (Valadares ym. 1999). Laskukaavana käytettiin seuraavaa:

$$\text{Virtsan määrä (l/pv)} = (\text{elopaino} \times \text{kreatiniinin eritysmäärä}) / \text{kreatiniinipitoisuus virtsassa}.$$
 Kreatiniinin eritysmäärän arvioitiin olevan 25 mg/elopaino-kg (Puhakka ym. 2016).

Rehu-, maito-, sonta- ja virtsanäytteiden kokonaisfosforipitoisuus laskettiin vähentämällä näytteiden konsentraatiosta nollanäytteen konsentraatio, eli typpihapon ja vetyperoksidin

mukana tulleet kivennäisaineet. Sonta- ja virtsanäytteiden epäorgaanisen fosforin pitoisuus laskettiin standardisuorasta regressioyhtälön avulla.

Sonnassa eritetyn fosforin määrä laskettiin näennäisen sulavuuden kautta. Laskukaavana käytettiin seuraavaa:

Sonnassa eritetyn fosforin määrä (g/pv) = $((1 - P \text{ näennäinen sulavuus}) / 1000) \times P \text{ saanti}$

Fosforitaseen laskukaavana käytettiin seuraavaa:

Fosforitase = P saanti – P eritys maidossa – P eritys sonnassa – P eritys virtsassa

Yksi suhteettoman suuri havainto poistettu aineistosta RSP-ruokintojen osalta seuraavista parametreistä: fosforin näennäinen sulavuus, sonnan kokonaisfosforipitoisuus, kokonaisfosforin ja epäorgaanisen fosforin erityys sonnassa, fosforin jakautuminen sontaan sekä fosforitase. Poikkeava havainto oli kaikissa tapauksissa yli kolmen hajonnan yksikön päässä aineiston keskiarvosta.

Tilastollisessa analyysissä käytettiin SAS:in Mixed Proceduren versiota 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Varianssianalyysien tilastomalli oli seuraava:

$$y_{ijklm} = \mu + S_i + A(S)_{ij} + P_k + D_l + (S \times D)_{il} + F_{ijklm}$$

Mallissa μ = keskiarvo, S = neliön vaikutus, A(S) = eläimen vaikutus neliön sisällä, P = jakson vaikutus, D = ruokinnan vaikutus, S \times D = blokin ja ruokinnan yhdysvaikutus ja F = virhetermi.

Analyysissä käytettiin seuraavia ortogonaalisia kontrasteja: 1. härkäpavun vertaaminen rypsiin (rypsi ja rypsi + spirulina vs. härkäpapu ja härkäpapu + spirulina), 2. härkäpavun ja rypsin valkuaisen osittainen korvaaminen spirulina-mikrolevän valkuaisella (rypsi ja härkäpapu vs. rypsi + spirulina ja härkäpapu + spirulina) ja 3. yhdysvaikutus perusvalkuaisrehun (rypsi ja härkäpapu) ja spirulinan välillä, joka kuvaa onko spirulinan vaikutus erilainen rypsin ja härkäpavun osittaisena korvaajana.

Ei-parametristä Kruskal-Wallis testin yksisuuntaista varianssianalyysiä käytettiin ei-normaalijakautuneille muuttujille.

Tuloksissa P-arvon ollessa $P < 0,001$ vaikutus oli erittäin merkitsevä, $P < 0,01$ on hyvin merkitsevä, $P < 0,05$ on merkitsevä ja $P < 0,10$ on suuntaa-antava.

7 Tulokset

7.1 Rehujen kemiallinen koostumus

Tutkituista valkuaisrehuista spirulina sisälsi eniten raakavalkuaista (taulukko 10). Rypsin ja härkäpavun raakavalkuaispitoisuuden ero oli vain 35 g/kg ka. Spirulina ei sisältänyt lainkaan NDF:ä, härkäpavussa sitä oli puolet rypsin pitoisuuksiin verrattuna. Spirulina sisälsi eniten rasvaa, toiseksi eniten rypsi ja vähiten härkäpapu. Säilörehu sisälsi vähän maito-, etikka- ja voi happoa. Valkuaisrehuista spirulina sisälsi eniten fosforia, toiseksi eniten rypsi ja vähiten härkäpapu (taulukko 11).

Taulukko 10. Rehujen kemiallinen koostumus

	Säilörehu	Ohra	Melassileike	Valkuaisrehut		
				Rypsi	Härkäpapu	<i>Spirulina platensis</i>
pH	4,84					
Kuiva-aine, g/kg	293	873	878	877	872	946
ME, MJ/kg ka	10,9	13,2	12,8	11,4	12,8	10,0
Kuiva-aineessa, g/kg						
Tuhka	107	25	71	84	43	68
Raakavalkuainen	159	121	169	345	310	683
NDF	505	201	358	318	158	0
Tärkkelys	29,6	599	130	32,0	346	34,9
Raakarasva	37,8	26,1	34,4	41,1	15,0	56,3
Maitohappo	35,9					
Etikkahappo	9,52					
Propionihappo	5,92					
Voihappo	<0,01					
Vesiliuk. hiilihydr.	90,8					
NH ₃ -N/kok. N, g/kg	95,2					
D-arvo, g/kg ka	681					

NDF neutraalidetergenttikuitu, ME muuntokelpoinen energia, Vesiliuk. hiilihydr. vesiliukoiset hiilihydraatit

Taulukko 11. Rehujen makrokivennäisaineiden pitoisuudet (g/kg ka)

	Säilörehu	Ohra	Melassi- leike	Kiven- näinen	Valkuaisrehut		
					Rypsi	Härkä- papu	<i>Spirulina platensis</i>
Ca	4,94	0,66	9,76	210	9,85	1,11	1,65
K	32,6	5,44	9,87	<0,70	12,9	12,8	14,1
Mg	1,53	1,33	3,35	60	5,66	1,53	3,06
Na	0,01	0,02	2,80	85	0,94	0,05	6,13
P	3,09	3,81	5,72	0,15	8,56	6,10	9,41
S	1,97	1,38	3,06		5,76	1,94	6,77

7.2 Rehujen syönti, ravintoaineiden saanti ja sulavuus

Lehmät söivät keskimäärin 22,9 kg kuiva-ainetta (taulukko 12). NDF:n ($P<0,05$) ja raakasvan ($P<0,001$) saanti olivat suurempia rypsirokuokinnalla kuin härkäpapuruokinnalla. Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, kuiva-aineen syönti ($P<0,05$), orgaanisen aineen saanti ($P<0,05$), NDF:n saanti ($P<0,01$) ja muuntokelpoisen energian saanti ($P<0,05$) pienenevät. Kuiva-aineen syönti ja NDF:n saanti pienenevät rypsirokuokinnalla 0,5 kg/pv (2,1 %) ja 0,48 kg/pv (5,2 %), vastaavasti, ja härkäpapuruokinnalla 0,8 kg/pv (3,5 %) ja 0,33 kg/pv (3,8 %), vastaavasti. Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, tärkkelyksen saanti suureni rypsirokuokinnalla ja pieneni härkäpapuruokinnalla ($P<0,01$, yhdysvaikutus) tärkkelyksen saannin ollessa keskimäärin pienempi rypsirokuokinnalla kuin härkäpapuruokinnalla ($P<0,01$).

Kuiva-aineen, orgaanisen aineen ja raakavalkeaisen näennäiset sulavuudet olivat pienempiä rypsirokuokinnalla kuin härkäpapuruokinnalla ($P<0,05$) (taulukko 13). Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, tärkkelyksen näennäinen sulavuus suureni rypsirokuokinnalla ja pieneni härkäpapuruokinnalla ($P<0,01$, yhdysvaikutus).

Taulukko 12. Rehujen syönti ja ravintoaineiden saanti

	Koekäsittelyt ¹				SEM	Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo ²		
	R	RSP	HP	HPSP		PV	KSP	PV×KSP
Havainnot (n)	32	32	32	32				
Syönti, kg/pv								
Kuiva-aine	23,3	22,8	23,1	22,3	0,57	0,198	0,037	0,500
Orgaaninen aine	21,2	20,8	21,1	20,3	0,52	0,281	0,042	0,450
NDF	9,17	8,69	8,60	8,27	0,216	<0,001	0,002	0,463
Tärkkelys	3,91	4,09	4,42	4,23	0,107	<0,001	0,919	0,006
Raakavalkuainen	3,86	3,88	3,84	3,77	0,098	0,246	0,581	0,370
Raakarasva	0,803	0,784	0,733	0,735	0,0197	<0,001	0,435	0,311
ME, MJ/pv	250	246	250	241	5,7	0,434	0,032	0,388

SEM keskiarvon keskivirhe, NDF neutraalidetergenttikuitu, ME muuntokelpoinen energia

¹ R= perusvalkuaisrehuna rypsi, RSP= perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen), HP= perusvalkuaisrehuna härkäpapu, HPSP= perusvalkuaisrehuna härkäpavun ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

² PV= Perusvalkuaisrehun lähteen tilastollinen merkitsevyys (R vs. HP), KSP= Perusvalkuaisrehun spirulinalla korvaamisen tilastollinen merkitsevyys ja PV × KSP= Yhdysvaikutus perusvalkuaisrehun lähteen ja spirulinalla korvaamisen välillä

Taulukko 13. Ravintoaineiden näennäinen sulavuus

	Koekäsittelyt ¹				SEM	Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo ²		
	R	RSP	HP	HPSP		PV	KSP	PV×KSP
Havainnot (n)	32	32	32	32				
Näennäinen sulavuus, g/kg								
Kuiva-aine	729	732	743	735	3,2	0,025	0,430	0,130
Orgaaninen aine	747	751	760	752	3,4	0,045	0,564	0,128
NDF	696	705	696	705	11,6	0,982	0,438	0,982
Tärkkelys	964	967	968	966	0,7	0,015	0,295	0,008
Raakavalkuainen	671	674	691	680	5,6	0,034	0,505	0,210

SEM keskiarvon keskivirhe, NDF neutraalidetergenttikuitu

¹ R= perusvalkuaisrehuna rypsi, RSP= perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen), HP= perusvalkuaisrehuna härkäpapu, HPSP= perusvalkuaisrehuna härkäpavun ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

² PV= Perusvalkuaisrehun lähteen tilastollinen merkitsevyys (R vs. HP), KSP= Perusvalkuaisrehun spirulinalla korvaamisen tilastollinen merkitsevyys ja PV × KSP= Yhdysvaikutus perusvalkuaisrehun lähteen ja spirulinalla korvaamisen välillä

7.3 Maidontuotanto

EKM-tuotos ($P<0,01$) oli suurempi ja rasvatuotos ($P<0,10$) suuntaa-antavasti suurempi rypsiruoekinnoilla kuin härkäpuruokinnolla (taulukko 14). Kun perusvalkuaisrehuista

korvattiin osa spirulinalla, maitotuotos ja laktoosin tuotos pienenevät rypsirookinnalla ja suurenevat härkäpapurookinnalla ($P<0,01$, yhdysvaikutus) maitotuotoksen ja laktoosin tuotoksen ollessa keskimäärin suurempia rypsirookinnoilla kuin härkäpapurookinnoilla ($P<0,01$). Maitotuotos pieneni rypsirookinnalla 1,0 kg/pv ja suureni härkäpapurookinnalla 1,2 kg/pv. Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, valkuaisen tuotos pieneni rypsirookinnalla ja suureni härkäpapurookinnalla suuntaa-antavasti ($P<0,10$, yhdysvaikutus) valkuaisen tuotoksen ollessa keskimäärin suurempi rypsirookinnoilla kuin härkäpapurookinnoilla ($P<0,001$).

Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, maidon rasvapitoisuus ($P<0,05$, yhdysvaikutus) ja valkuaispitoisuus ($P<0,01$, yhdysvaikutus) suurenevat rypsirookinnalla ja pienenevät härkäpapurookinnalla. Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, rehunhyötysuhde (EKM/kg syönti kg) pysyi samana rypsirookinnalla ja suureni härkäpapurookinnalla ($P=0,05$, yhdysvaikutus) rehunhyötysuhteen ollessa keskimäärin suurempi rypsirookinnoilla kuin härkäpapurookinnoilla ($P<0,05$).

Taulukko 14. Maitotuotos ja maidon koostumus

	Koekäsittelyt ¹				Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo ²			
	R	RSP	HP	HPSP	SEM	PV	KSP	PV×KSP
Havainnot (n)	32	32	32	32				
Maito, kg/pv	31,0	30,0	28,5	29,7	0,53	<0,001	0,857	0,002
EKM, kg/pv	34,1	33,8	32,3	32,9	0,86	0,006	0,696	0,303
Rasva, g/pv	1469	1483	1414	1433	51,9	0,074	0,552	0,942
Valkuainen, g/pv	1127	1106	1050	1070	23,4	<0,001	0,959	0,058
Laktoosi, g/pv	1383	1328	1276	1320	27,0	0,002	0,718	0,005
Maidon koostumus, g/kg								
Rasva	47,4	49,4	49,2	48,1	1,46	0,694	0,562	0,042
Valkuainen	36,5	37,1	36,9	36,2	0,80	0,192	0,911	0,004
Laktoosi	44,6	44,2	44,6	44,4	0,36	0,673	0,334	0,824
EKM/ka syönti kg	1,42	1,44	1,35	1,43	0,004	0,026	0,011	0,050

SEM keskiarvon keskivirhe, EKM energiakorjattu maitotuotos

¹ R= perusvalkuaisrehuna rypsi, RSP= perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen), HP= perusvalkuaisrehuna härkäpuru, HPSP= perusvalkuaisrehuna härkäpuru ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

² PV= Perusvalkuaisrehun lähteen tilastollinen merkitsevyys (R vs. HP), KSP= Perusvalkuaisrehun spirulinalla korvaamisen tilastollinen merkitsevyys ja PV × KSP= Yhdysvaikutus perusvalkuaisrehun lähteen ja spirulinalla korvaamisen välillä

7.4 Fosfori

Fosforin saanti ($P<0,01$) ja erityis maidossa ($P<0,05$) olivat suurempia rypsirokinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla (taulukko 15). Fosforin näennäinen sulavuus ($P<0,05$) oli pienempi rypsirokinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla. Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, fosforin saanti pieneni ($P<0,05$). Fosforin saanti pieneni rypsirokinnoilla 3,6 g/pv (3,9 %) ja härkäpapuruokinnalla 2,8 g/pv (3,2 %). Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, ruokinnan fosforipitoisuus pieneni rypsirokinnoilla ja pysyi samana härkäpapuruokinnalla ($P<0,05$, yhdysvaikutus) ruokinnan fosforipitoisuuden ollessa keskimäärin suurempi rypsirokinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla ($P<0,001$). Vaikka numeeriset muutokset ovat pieniä, ne ovat merkitseviä.

Taulukko 15. Fosforin saanti, näennäinen sulavuus ja erityis maidossa

	Koekäsittelyt ¹					Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo ²		
	R	RSP	HP	HPSP	SEM	PV	KSP	PV×KSP
Havainnot (n)	32	32 ³	32	32				
Ruokinnassa, g/kg ka	3,93	3,90	3,75	3,76	0,022	<0,001	0,105	0,033
Saanti, g/pv	91,7	88,1	86,6	83,8	2,31	0,003	0,022	0,757
Näenn.sulavuus, g/kg	270	272	340	310	30,5	0,045	0,575	0,518
Maidossa, g/kg	0,892	0,960	0,880	0,876	0,0392	0,185	0,360	0,309
Maidossa, g/pv	27,6	28,7	25,2	25,9	1,19	0,016	0,346	0,821

SEM keskiarvon keskivirhe, P fosfori, näenn. sulavuus näennäinen sulavuus

¹ R= perusvalkuaisrehuna rypsi, RSP= perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen), HP= perusvalkuaisrehuna härkäpapu, HPSP= perusvalkuaisrehuna härkäpavun ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

² PV= Perusvalkuaisrehun lähteen tilastollinen merkitsevyys (R vs. HP), KSP= Perusvalkuaisrehun spirulinalla korvaamisen tilastollinen merkitsevyys ja PV × KSP= Yhdysvaikutus perusvalkuaisrehun lähteen ja spirulinalla korvaamisen välillä

³ Yksi suhteettoman suuri havainto poistettu RSP-ruokinnalta fosforin näennäisen sulavuuden osalta (n=31), havainto oli yli kolmen hajonnan yksikön päässä aineiston keskiarvosta. Muiden ruokintojen (R, HP, HPSP) osalta taulukossa raportoitu SEM tulee kertoa luvulla 0,927

Kokonaisfosforin ja liukoisen kokonaisfosforin pitoisuus sonnassa olivat suuntaa-antavasti suurempia rypsirokinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla ($P<0,10$) (taulukko 16). Kokonais-, epäorgaanisen ja liukoisen kokonaisfosforin erityis sonnassa olivat suurempia rypsirokinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla ($P<0,01$). Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, liukoisen kokonaisfosforin erityis sonnassa pienentyi ($P<0,05$).

Fosforin jakautuminen sontaan oli suurempaa rypsirokinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla ($P<0,05$) (taulukko 18). Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, fosforin hyväksikäyttö maidontuotantoon suurentui suuntaa-antavasti ($P<0,10$). Lehmien fosforitase oli pienempi rypsirokinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla ($P<0,05$) (kuva 4). Epäorgaanisen fosforin pitoisuus ja erityis virtsassa olivat suurempia rypsirokinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla ($P<0,05$) (taulukko 17).

Taulukko 16. Fosforin pitoisuus ja erityis sonnassa

	Koekäsittelyt ¹				SEM	Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo ²		
	R	RSP	HP	HPSP		PV	KSP	PV×KSP
Havainnot (n)	32	32 ³	32	32				
Fosforin pitoisuus sonnassa, g/kg ka								
Kokonais	10,6	10,3	9,62	9,82	0,450	0,066	0,882	0,508
Epäorgaaninen	10,5	10,3	9,74	9,70	0,286	Ei normaalijakautunut ⁴		
Liuk. kokonais	0,122	0,112	0,110	0,105	0,0096	0,076	0,173	0,656
Liuk. epäorg.	0,129	0,122	0,121	0,120	0,0094	Ei normaalijakautunut ⁴		
Fosforin erityis sonnassa, g/pv								
Kokonais	67,4	64,8	57,2	57,9	3,64	0,002	0,674	0,480
Epäorgaaninen ⁵	1,80	1,78	1,75	1,74	0,020	0,003	0,333	0,482
	(64,2)	(61,1)	(55,9)	(55,8)				
Liuk. kokonais ⁶	0,863	0,809	0,790	0,757	0,0459	0,008	0,049	0,617
	(0,752)	(0,673)	(0,627)	(0,600)				
Liuk. epäorg.	0,792	0,726	0,691	0,681	0,0607	Ei normaalijakautunut ⁴		

SEM keskiarvon keskivirhe, liuk. liukoinen, epäorg. epäorgaaninen

¹ R= perusvalkuaisrehuna rypsi, RSP= perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen), HP= perusvalkuaisrehuna härkäpavu, HPSP= perusvalkuaisrehuna härkäpavun ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

² PV= Perusvalkuaisrehun lähteen tilastollinen merkitsevyys (R vs. HP), KSP= Perusvalkuaisrehun spirulinalla korvaamisen tilastollinen merkitsevyys ja PV × KSP= Yhdysvaikutus perusvalkuaisrehun lähteen ja spirulinalla korvaamisen välillä

³ Yksi suhteettoman suuri havainto poistettu RSP-ruokinnalta sonnan kokonaisfosforipitoisuuden ja -erityksen osalta (n=31), havainto oli yli kolmen hajonnan yksikön päässä aineiston keskiarvosta. Muiden ruokintojen (R, HP, HPSP) osalta taulukossa raportoitu SEM tulee kertoa luvulla 0,927

⁴ Tehty parivertailu Kruskal-Wallis testillä

⁵ 10-kantainen logaritmimuunnos normaalijakautuneisuuden saamiseksi, alkuperäiset arvot suluissa

⁶ 10-kantainen logaritmimuunnos + 1 normaalijakautuneisuuden saamiseksi, alkuperäiset arvot suluissa

Taulukko 17. Virtsan erityys ja fosforin pitoisuus ja erityys virtsassa

	Koekäsittelyt ¹				SEM	Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo ²		
	R	RSP	HP	HPSP		PV	KSP	PV×KSP
Havainnot (n)	32	32	32	32				
Virtsa, l/pv	32,2	31,7	31,4	32,2	0,91	0,973	0,833	0,287
Fosforin pitoisuus virtsassa, mg/l								
Kokonais	9,64	9,55	9,48	8,89	0,847	0,324	0,413	0,550
Epäorgaaninen	3,22	2,93	2,76	2,53	0,238	0,030	0,173	0,882
Fosforin erityys virtsassa, mg/pv								
Kokonais	305	296	294	284	20,3	0,311	0,425	0,949
Epäorgaaninen	101	92	87	81	6,5	0,040	0,192	0,726

SEM keskiarvon keskivirhe

¹ R= perusvalkuaisrehuna rypsi, RSP= perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen), HP= perusvalkuaisrehuna härkäpapu, HPSP= perusvalkuaisrehuna härkäpavun ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

² PV= Perusvalkuaisrehun lähteen tilastollinen merkitsevyys (R vs. HP), KSP= Perusvalkuaisrehun spirulinalla korvaamisen tilastollinen merkitsevyys ja PV × KSP= Yhdysvaikutus perusvalkuaisrehun lähteen ja spirulinalla korvaamisen välillä

Taulukko 18. Fosforin saannin jakautuminen maitoon, virtsaan ja sontaan

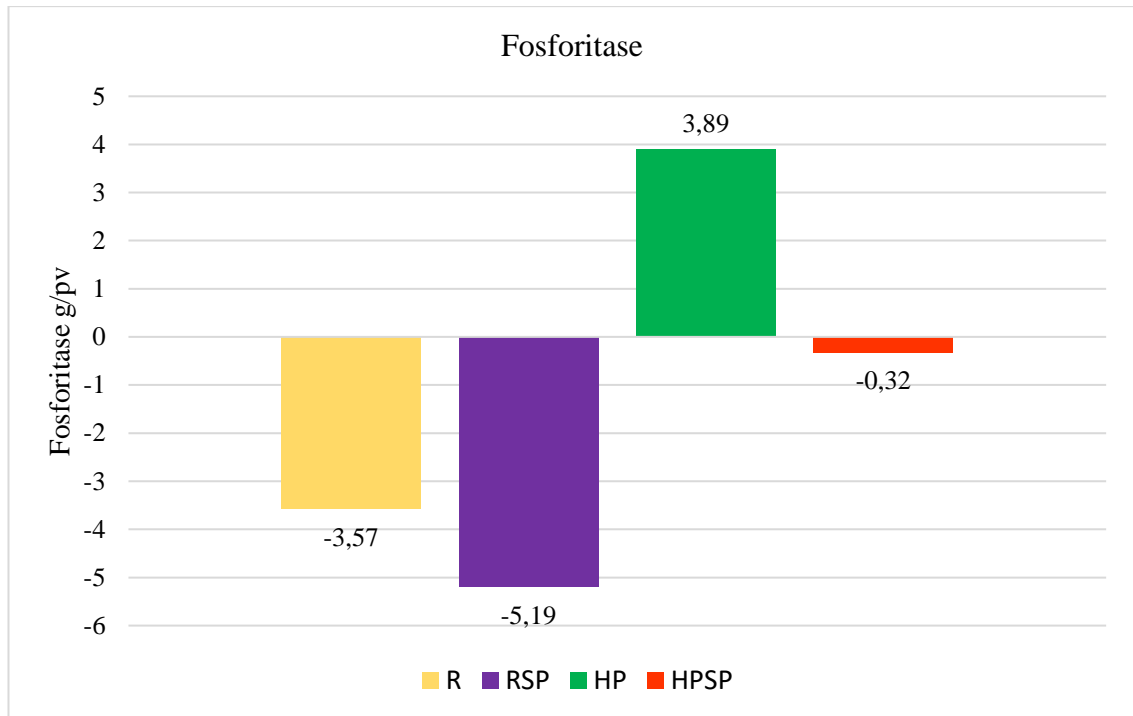
	Koekäsittelyt ¹				SEM	Tilastollinen merkitsevyys, P-arvo ²		
	R	RSP	HP	HPSP		PV	KSP	PV×KSP
Havainnot (n)	32	32 ³	32	32				
P jakautuminen, erityys/saanti, %								
Maito	30,3	32,7	29,1	31,0	1,64	0,230	0,073	0,831
Virtsa	0,334	0,339	0,341	0,342	0,0275	0,806	0,905	0,950
Sonta	73,0	72,8	66,0	69,0	3,05	0,045	0,575	0,518

SEM keskiarvon keskivirhe, P fosfori

¹ R= perusvalkuaisrehuna rypsi, RSP= perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen), HP= perusvalkuaisrehuna härkäpapu, HPSP= perusvalkuaisrehuna härkäpavun ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

² PV= Perusvalkuaisrehun lähteen tilastollinen merkitsevyys (R vs. HP), KSP= Perusvalkuaisrehun spirulinalla korvaamisen tilastollinen merkitsevyys ja PV × KSP= Yhdysvaikutus perusvalkuaisrehun lähteen ja spirulinalla korvaamisen välillä

³ Yksi suhteettoman suuri havainto poistettu RSP-ruokinnalta fosforin jakautumisen sontaan osalta (n=31), havainto oli yli kolmen hajonnan yksikön päässä aineiston keskiarvosta. Muiden ruokintojen (R, HP, HPSP) osalta taulukossa raportoitu SEM tulee kertoa luvulla 0,927



Kuva 4. Lypsylehmien fosforitase eri valkuaisrehuruokinnnoilla

SEM= 2,936, P-arvot PV= 0,042, KSP= 0,308, PV×KSP= 0,645

PV= Perusvalkuaisrehun lähteen tilastollinen merkitsevyys (R vs. HP), KSP= Perusvalkuaisrehun spirulinalla korvaamisen tilastollinen merkitsevyys ja PV × KSP= Yhdysvaikutus perusvalkuaisrehun lähteen ja spirulinalla korvaamisen välillä

R= perusvalkuaisrehuna rypsi, RSP= perusvalkuaisrehuna rypsin ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen), HP= perusvalkuaisrehuna härkäpapu, HPSP= perusvalkuaisrehuna härkäpavun ja *Spirulina platensis* -mikrolevän sekoitus (1:1 valkuaisen suhteen)

Yksi suhteettoman suuri havainto poistettu RSP-ruokinnalta (n=31), havainto oli yli kolmen hajonnan yksikön päässä aineiston keskiarvosta. Muiden ruokintojen (R, HP, HPSP) osalta kuvassa raportoitu SEM tulee kertoa luvulla 0,927

8 Tulosten tarkastelu

8.1 Rehut ja koeruokinnan koostumus

Tutkimuksessa käytetyn säilörehun ruokinnallinen arvo oli hyvä. Säilörehussa ei havaittu virheikäymistä ja maito-, etikka- sekä voihiappopitoisuudet olivat pienet. Säilörehun pH oli hieman korkea, jonka vuoksi ammoniumtypen osuus kokonaistypestä oli vain tyydyttävällä tasolla. Säilörehussa oli myös melko paljon jäännössokeria.

Nurmisäilörehun raakavalkuaispitoisuus vastasi suomalaisten rehutaulukoiden (Luke 2018) 2. sadon raakavalkuaispitoisuutta. Rehutaulukoissa (Luke 2018) annettuun rypsi-rouheen raakavalkuaispitoisuuteen (379 g/kg ka) verrattuna tutkimuksen rypsi-rouheen raakavalkuaispitoisuus oli pieni. Härkäpavun raakavalkuaispitoisuus oli samalla tasolla kuin on aiemmin havaittu (Luke 2018, Crépon ym. 2010). Créponin ym. 2010 mukaan härkäpavun raakavalkuaispitoisuus vaihtelee 270–320 g/kg ka. Nyt tehdyssä tutkimuksessa spirulinan raakavalkuaispitoisuus oli noin kaksi kertaa rypsin ja härkäpavun raakavalkuaispitoisuutta suurempi. Spirulinan raakavalkuaispitoisuus oli samalla tasolla kuin aiemmissa tutkimuksissa todetut pitoisuudet 675 g/kg ka (Costa ym. 2016) ja 687-697 g/kg ka (Lamminen ym. 2017). Becker ym. (2007) raportoivat spirulinan raakavalkuaispitoisuuden pienemmäksi, 460-630 g/kg ka.

Säilörehun fosforipitoisuus oli samankaltainen kuin Mustosen ym. (2014) tutkimuksessa. Heidän mukaansa nurmen fosforipitoisuuteen vaikuttavat mm. fosforilannoitus, kasvu-kauden sääolosuhteet ja nurmen kasvua-aste korjuuaikana. Säilörehun osuus kuiva-ai-keen syönnistä on suuri, joten myös säilörehun fosforipitoisuus tulisi olla kohtuullinen. Rypsin fosforipitoisuus oli tässä tutkimuksessa 35 % pienempi kuin rehutaulukoiden (Luke 2018) arvo. Myös muissa tutkimuksissa (Tuori ym. 2006, Huuskonen ym. 2007) on raportoitu rehutaulukoiden (Luke 2018) arvoja pienempiä rypsin fosforipitoisuuksia, mutta ne ovat olleet kuitenkin suurempia kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa, 10,54 g/kg ka (Tuori ym. 2006) ja 10,89 g/kg ka (Huuskonen ym. 2007). Rypsin NDF-pitoisuus oli suurempi kuin rehutaulukoiden (Luke 2018) arvo. Härkäpavun fosforipitoisuus oli samalla tasolla rehutaulukoiden (Luke 2018) pitoisuuden 5,7 g/kg ka ja Fangin ym. (2007) tutkimuksen pitoisuuden 6,2 g/kg ka kanssa. Härkäpavun NDF-pitoisuus oli samalla tasolla kuin rehutaulukoiden (Luke 2018) arvo. Spirulinan fosforipitoisuus oli samalla tasolla kuin aikaisemmin julkaistut pitoisuudet 7,8 g/kg ka (Yoshida ja Hoshii 1980), 7,03-8,03 g/kg ka (Tokusoglu ja Ünal 2003) ja 8,6 g/kg ka (Costa ym. 2016). Spirulina ei sisältänyt lainkaan NDF:ää, mikä on todettu myös Lammisen ym. (2017) tutkimuksessa. Spirulinan fosfori:raakavalkuaissuhde (0,014) on pienempi kuin rypsin (0,025) ja härkäpavun (0,020).

8.2 Syönti ja ravintoaineiden saanti

Toisin kuin Puhakan ym. (2016) tutkimuksessa, nyt tehdyssä tutkimuksessa kuiva-aineen syönnissä ei ollut eroja rypsi- ja härkäpapuruokintojen välillä. Puhakan ym. (2016) tutkimuksessa rypsin korvaaminen härkäpavulla pienensi lineaarisesti säilörehun ja kokonaiskuiva-aineen syöntiä. Heidän kokeessaan oli kuitenkin erillisruokinta, mikä on voinut vaikuttaa tulokseen.

Kun rypsiä tai härkäpavusta korvattiin osa spirulinalla, seosrehun kuiva-aineen syönti pieneni rypsi-ruokinnalla 0,5 kg ka/pv (2,1 %) ja härkäpapuruokinnalla 0,8 kg ka/pv (3,5 %). Seosrehun kuiva-aineen syönnin pienentyminen johtui todennäköisesti spirulinan heikommasta maittavuudesta. Mikrolevien haju, maku tai jauhemainen koostumus voivat aiheuttaa maittavuusongelmia (Lamminen ym. 2017). Kun soijaa korvattiin spirulinalla Lammisen ym. (2016) erillisruokinta-tutkimuksessa, väkirehun syönti pieneni 1,8 kg ka/pv (16,5 %) ja karkearehun suureni 2,3 kg ka/pv (21,7 %). Lammisen ym. (2017) tutkimuksen toisessa kokeessa rypsin korvaaminen osittain spirulinalla pienensi väkirehun syöntiä 0,3 kg ka/pv (2,9 %). Samassa kokeessa väkirehun kuiva-aineen syönti pieneni 0,91 kg ka/pv (8,7 %), kun rypsi korvattiin kokonaan spirulinalla. Lammisen ym. (2016, 2017) tutkimuksissa lehmät kompensoivat pienempää väkirehun syöntiä syömällä enemmän säilörehua, jolloin kokonaiskuiva-aineen syönnissä ei ollut eroja. DeVriesin ja Keyserlingin (2009) mukaan erillisruokinnan ja seosrehuruokinnan kokonaiskuiva-aineen syönnissä ei ole eroa, mutta heidän tutkimuksessaan ruokinnoissa ei ollut mukana selvästi huonosti maittavaa rehua. Seosrehuruokinnalla lehmät valikoivat rehua vähemmän (DeVries ja Keyserling 2009), jolloin huonosti maittavan rehun vaikutusta syöntiin on vaikea ennustaa. Kuitenkin seosrehuruokinta voi auttaa laimentamaan huonosti maittavan rehun makua. Tässä tutkimuksessa spirulinan sekoittaminen seosrehuun ei poistanut täysin spirulinan negatiivisia vaikutuksia kuiva-aineen syöntiin. Lisätutkimusta tarvitaan levien maittavuudesta ja vaikutuksista kuiva-aineen syöntiin.

Raakavalkuaisen saannissa ei ollut eroja eri ruokintojen välillä, vaikka kuiva-aineen syönti pieneni, kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla. Valkuaisrehut vaikuttavat kuitenkin ruokinnan aminohappokoostumukseen. Rypsi sisältää enemmän histidiiniä kuin spirulina (Lamminen ym. 2017), ja rypsi sekä spirulina (Lamminen ym. 2017)

sisältävät enemmän metioniinia kuin härkäpapu (Luke 2018). Ruokintojen aminohapposuhteita on käsitelty tämän tutkimuksen osalta tarkemmin Tarsian (2016) maisterintutkielmassa.

Ruokinnan fosforipitoisuus voi vaikuttaa lehmien kuiva-aineen syöntiin ja ravintoaineiden sulavuuksiin, mutta sitä on havaittu vain, kun ruokinnan fosforipitoisuus ei ole todennäköisesti ollut riittävä lypsylehmän tarpeisiin nähden (Puggaard ym. 2014). Todennäköisesti liian pieni ruokinnan fosforipitoisuus heikentää pötsifermentaatiota ja sitä kautta pienentää kuiva-aineen syöntiä ja orgaanisen aineen sulavuutta (Kincaid ja Rodehutsord 2005). Eri tutkimuksissa (Ekelund ym. 2005, Puggaard ym. 2011, 2014) on havaittu vaihtelevia vaikutuksia kuiva-aineen syöntiin ja ravintoaineiden sulavuuksiin, kun ruokinnan fosforipitoisuus on ollut alle NRC:n (2001) suositteleman. Puggaard ym. (2014) havaitsivat kuiva-aineen syönnin pienenevän, kun ruokinnan fosforipitoisuus pieneni pitoisuuksista 2,8 ja 3,4 g/kg ka pitoisuuteen 2,3 g/kg ka. Puggaard ym. (2011) havaitsivat NDF:n näennäisen sulavuuden pienevän, kun ruokinnan fosforipitoisuus pieneni pitoisuudesta 3,4 g/kg ka pitoisuuteen 2,4 g/kg ka. Puggaard ym. (2011) eivät kuitenkaan olleet varmoja, heikkenikö pötsimikrobien toiminta ruokinnan pienemmän fosforipitoisuuden vuoksi vai olivatko lehmät syöneet kuivikkeitaan, joka vaikuttaa NDF:n sulavuuteen. Kuitenkaan Ekelund ym. (2005) eivät havainneet orgaanisen aineen sulavuudessa eroa, kun ruokinta sisälsi fosforia 2,4-7,8 g/kg ka. Todennäköisesti nyt tehdyssä tutkimuksessa kuiva-aineen syönnin pienentyminen ei johtunut ruokintojen fosforipitoisuuksista, koska ruokintojen fosforipitoisuudet olivat vähintään suositusten mukaisia ja näin riittäviä lypsylehmälle.

Fosforin saanti oli suurempaa rypsiruoKinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla, koska ruokinnan fosforipitoisuudet olivat suuremmat rypsiruoKinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla. Rypsin fosforipitoisuus oli tässä tutkimuksessa tavallista pienempi, jolloin fosforin saantien erot jäivät numeerisesti pieniksi. Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, fosforin saanti pieneni. Vaikka spirulinan fosforipitoisuus on suurempi kuin rypsin ja härkäpavun, spirulinan suuremman raakavalkuaispitoisuuden ansiosta sen syöttömäärä on pienempi kuin rypsin ja härkäpavun. Myös ohra vaikutti siihen, miten paljon fosforia saatiin mistäkin rehusta, koska ohran määrällä vakioitiin seosrehun karkearehu:väkirehu suhde. Ohran fosforipitoisuus oli 3,81 g/kg ka. Ohran määrä lisääntyi, kun

perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla ja pieneni, kun rypsi korvattiin härkäpavulla.

Fosforin näennäinen sulavuus oli pienempi rypsirokuokkinnoilla kuin härkäpapuruokkinnoilla, mikä johtui todennäköisesti siitä, että ruokintojen fosforipitoisuudet ja fosforin saannit olivat suurempia rypsirokuokkinnoilla kuin härkäpapuruokkinnoilla. Nyt tehdyssä tutkimuksessa fosforin näennäiset sulavuudet (keskimäärin 298 g/kg) olivat pieniä ruokintojen fosforipitoisuuksiin nähden. Tuorin ym. (2006) tutkimuksessa käytettiin valkuaisrehuna rypsiä. Heidän tutkimuksessaan fosforin näennäinen sulavuus oli 391 g/kg ka, kun ruokinnan fosforipitoisuus oli n. 4,0 g/kg ka ja 379 g/kg ka, kun ruokinnan fosforipitoisuus oli n. 4,7 g/kg ka. Ekelund ym. (2005) ja Odongo ym. (2007) havaitsivat fosforin näennäisen sulavuuden pienevän, kun fosforin pitoisuus ruokinnassa lisääntyi. Tätä ei kuitenkaan havaittu kaikissa tutkimuksissa (Puggaard ym. 2011). Ekelund ym. (2005) tutkimuksessa fosforin näennäinen sulavuus oli 209-369 g/kg ka riippuen ruokinnan fosforipitoisuuksista (2,4-7,8 g/kg ka). Odongon ym. (2007) tutkimuksessa fosforin näennäinen sulavuus oli 397 tai 413 g/kg ka, kun ruokinnan fosforipitoisuudet olivat 4,2 ja 3,5 g/kg ka. Kun verrataan Ekelundin ym. (2005) ja Odongon ym. (2007) tutkimusten fosforien näennäisiä sulavuuksia ja ruokintojen fosforipitoisuuksia, voidaan havaita, että ruokinnan fosforipitoisuuden lisäksi myös muut tekijät voivat vaikuttaa fosforin näennäiseen sulavuuteen. Esimerkiksi Kincaid ym. (2005) havaitsivat fosforin näennäisen sulavuuden vaihtelevan eri rehujen välillä.

8.3 Maitotuotos

Hypoteesin mukaisesti rypsirokuokkinnoilla maitotuotos ja EKM-tuotos olivat suurempia kuin härkäpapuruokkinnoilla. Samoin Puhakan ym. (2016) tutkimuksen mukaan rypsin korvaaminen härkäpavulla pienentää maitotuotosta sekä EKM-tuotosta. Suurempi maitotuotos rypsirokuokkinnoilla johtui todennäköisesti siitä, että härkäpavun aminohappokoostumus ei ole yhtä tasapainoinen kuin rypsin. Härkäpavun rypsiä pienempi metioniinipitoisuus voi olla syy pienempään maitotuotokseen. Robinsonin (2010) mukaan metioniini voi olla yksi ensimmäisenä maidontuotantoa rajoittavista aminohapoista.

Kun rypsiä korvattiin osittain spirulinalla, maitotuotos ja kuiva-aineen syönti pienenevät. Rehunhyötysuhde (EKM/ka syönti kg) ei muuttunut rypsiruo-kinnoilla, joten todennäköisesti pienempi maitotuotos johtui pienentyneestä kuiva-aineen syönnistä. Kuiva-aineen syönnillä ja maitotuotoksella on todettu olevan vahva positiivinen korrelaatio (Huhtanen ym. 2011). Myös Lammisen ym. (2017) tutkimuksen toisessa kokeessa rypsin korvaaminen spirulinalla pienensi numeerisesti maitotuotosta. Nyt tehdyssä tutkimuksessa härkápavun korvaaminen osittain spirulinalla suurensi maitotuotosta. Tämä johtui todennäköisesti spirulinan suuremmasta metioniinipitoisuudesta.

Maidon rasvatuotos oli suuntaa-antavasti suurempi rypsiruo-kinnoilla kuin härkápapuruo-kinnoilla, mikä johtuu rypsiruo-kin-
tojen suuremmasta maitotuotoksesta. Kun perusvalkuaisrehuista korvattiin osa spirulinalla, rypsiruo-kin-
nalla maidon rasvapitoisuus suureni ja härkápapuruo-kin-
nalla pieneni. Erot johtuvat maitotuotoksen muutoksista eli rypsiruo-kin-
nalla konsentroitumisesta ja härkápapuruo-kin-
nalla laimentumisesta, koska perusvalkuai-
sen korvaaminen spirulinalla pienensi maitotuotosta rypsiruo-kin-
nalla ja suurensi härkápapuruo-kin-
nalla. Maidon rasvatuotosta- ja pitoisuutta on käsitelty tämän tutkimuksen osalta tarkemmin Mäkisen (2017) maisterintutkielmassa. Toisin kuin nyt tehdyssä tutki-
muksessa, Lammisen ym. (2017) tutkimuksen toisessa kokeessa rypsin korvaaminen spi-
rulinalla ei vaikuttanut maidon rasvapitoisuuteen eikä -tuotokseen.

Maidon valkuaistuotos oli suuntaa-antavasti suurempi rypsiruo-kinnoilla kuin härkápapu-
ruo-kinnoilla. Tähän vaikutti ainakin rypsiruo-kin-
tojen suurempi maitotuotos. Kun rypsistä
korvattiin osa spirulinalla, maidon valkuaistuotos pieneni, vaikka maidon valkuaispitoi-
suus suureni. Myös Lammisen ym. (2017) tutkimuksen toisessa kokeessa havaittiin ryp-
sin korvaamisen spirulinalla pienentävän valkuaistuotosta suuntaa-antavasti. Kun härkápavusta korvattiin osa spirulinalla, valkuaistuotos suureni, vaikka maidon valkuaispitoi-
suus pieneni. Erot saattavat johtua rasvatuotoserojen lailla konsentroitumisesta ja laimen-
tumisesta.

Kun maidon laktoosipitoisuuksissa ei ollut eroja eri ruokintojen välillä, vain maitotuotos vaikuttaa laktoosituotokseen. Suurempi maitotuotos selittää rypsiruo-kin-
tojen suuremman laktoosituotoksen verrattuna härkápapuruo-kin-
toihin. Maitotuotoksen muutokset selittä-
vät myös, miksi rypsin korvaaminen spirulinalla pienensi laktoosituotosta ja härkápavun korvaaminen spirulinalla suurensi laktoosituotosta. Maidon laktoosipitoisuus vaihtelee

hyvin vähän ja yleensä ruokinnalla ei ole siihen vaikutusta (Jokela ym. 1998). Poikkeuksellisesti Lammisen ym. (2017) tutkimuksen toisessa kokeessa maidon laktoosipitoisuuden pieneni suuntaa-antavasti rypsin ja spirulinan sekoituksella.

Ruokinnan fosforipitoisuus ei yleensä vaikuta maitotuotokseen (Tallam ym. 2005, Puggaard ym. 2011) eikä maidon koostumukseen (Tallam ym. 2005, Elizondo Salazar ym. 2013). Vaikutuksia maidon fosforipitoisuuteen on havaittu vain, jos ruokinnan fosforipitoisuus on ollut hyvin alhainen ja lehmä on kärsinyt sen vuoksi fosforinpuutoksesta (Valk ja Šebek, 1999), jolloin pötsimikrobien toiminta voi häiriintyä ja lehmän kuiva-aineen syönti pienentyä. Puggaardin ym. (2014) tutkimuksessa ruokinnan fosforipitoisuuden ollessa 2,3 g/kg ka maitotuotos alkoi pienentyä kuusi viikkoa poikimisen jälkeen. Samalla ruokinnalla maidon valkuaistuotos oli pienempi kuin niillä ruokinnoilla, jotka sisälsivät enemmän fosforia. Heidän tutkimuksessaan ruokinnan fosforipitoisuuksien ollessa 2,8-3,4 g/kg ka ei havaittu eroja maidon valkuais-, rasva- eikä laktoosituotoksissa. Kuitenkin Puggaardin ym. (2011) tutkimuksessa ei havaittu eroa maitotuotoksessa ruokinnan fosforipitoisuuden ollessa 2,4-3,4 g/kg ka, mutta kyseisessä tutkimuksessa maitotuotostasoa oli pienempi kuin Puggaardin ym. (2014) tutkimuksessa. Tutkimusten väliset erot voivat johtua tuotostasojen erosta. Poikkeuksellisesti Wangin ym. (2014) tutkimuksessa maidon rasvapitoisuuksissa oli eroja riippuen ruokinnan fosforipitoisuudesta, mutta lineaarista pienentymistä ei havaittu. Heidän tutkimuksessaan oli kolme eri ruokinnan fosforipitoisuutta ja maidon rasvapitoisuus oli pienin keskimmaisella ruokinnan fosforipitoisuudella. Maidon valkuais- ja laktoosipitoisuuksissa ei havaittua eroa. Pienentynyt maitotuotos voi lisätä fosforin erityystä sontoan, kun fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa heikkenee. Tutkimuksessamme lehmien fosforin tarve täyttyi ja ruokintojen fosforipitoisuudet eivät rajoittaneet maidontuotantoa.

Maidon fosforipitoisuus oli samalla tasolla muiden aikaisempien tutkimusten (mm. Puggaard ym. 2011, Elizondo Salazar ym. 2013) ja Klopın ym. (2013) meta-analyysin kanssa. Näissä tutkimuksissa maidon fosforipitoisuudet olivat 0,820-0,838 g/kg (Puggaard ym. 2011) ja 0,885-0,917 g/kg (Elizondo Salazar ym. 2013). Klopın ym. (2013) meta-analyysin mukaan maidon fosforipitoisuus oli keskimäärin 0,89 g/kg. Klopın ym. (2013) mukaan ruokinnan fosforipitoisuus ei vaikuta maidon fosforipitoisuuteen. Heidän mukaansa maidon fosforipitoisuudessa voi esiintyä vaihtelua johtuen mm. vuodenajasta, ruokin-

nasta tai tuotoskauden vaiheesta. Poikkeuksellisesti Puggaardin ym. (2011) tutkimuksessa pienin ruokinnan fosforipitoisuus (2,4 g/kg ka) pienensi maidon fosforipitoisuutta suuntaa-antavasti. Maidon fosforipitoisuuksissa ei ollut eroja eri ruokintojen välillä, joten suurempi fosforin erityys maidossa rypsiruoкинnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla johtuu maitotuotoksen eroista.

8.4 Fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa sekä erityis virtsaan ja sontaan

Fosforin hyväksikäyttö maidontuotantoon oli keskimäärin yhtä tehokasta rypsiruoкинnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla. Kun härkäpapua korvattiin osittain spirulinalla, hypoteesin mukaisesti fosforin hyväksikäyttö tehostui suuntaa-antavasti suuremman maitotuotoksen vuoksi. Tämä osoitti, että härkäpapu voi olla toimiva valkuaisrehu tehostamaan fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa, kun härkäpavun maidontuotantovastetta parannetaan täydentämällä sen aminohappokoostumusta metioniinipitoisella rehulla. Morsen ym. (1992b) ja Yrjänäisen ym. (2003) tutkimuksien mukaan ruokinnan fosforipitoisuuden suurentuessa, fosforin hyväksikäyttö maidontuotantoon pienenee. Tämä selittää miksi fosforin hyväksikäyttö maidontuotantoon tehostui suuntaa-antavasti myös, kun rypsiä korvattiin osittain spirulinalla, vaikka maitotuotos pienentyi. Maitotuotos on merkittävä fosforinielu eikä ruokinnan fosforipitoisuus vaikuta maidon fosforipitoisuuteen, joten hyvän maitotuotoksen ylläpito on tärkeää samalla kun ruokinnan fosforipitoisuutta pienennetään. Ruokinnan pienemmästä fosforipitoisuudesta saadut hyödyt voivat kumoutua, jos maitotuotos pienenee. Ruokinnan typpi-energiyasuhde ja tasapainoinen aminohappokoostumus vaikuttavat siihen, miten tehokasta ravintoaineiden hyväksikäyttö on maitotuotokseen.

Fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa (keskimäärin 30,8 %) oli hieman tehokkaampaa kuin Morsen ym. (1992) tutkimuksessa, kun verrataan tutkimusten fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa, ruokinnan fosforipitoisuutta ja maitotuotosta. Morsen ym. (1992) tutkimuksessa fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa oli 30,3 %, kun ruokinnan fosforipitoisuus oli 4,1 g/kg ka ja maitotuotos 24 kg/pv. Kuitenkin Knowltonin ja Herbeinin (2002) tutkimuksessa fosforin hyväksikäyttö maidontuotannossa oli tehokkaampaa (n. 33 %) kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa, vaikka ruokinnan fosforipitoisuus oli suurempi (5,1 g/kg ka). Heidän tutkimuksessaan maitotuotos (48,4 kg/pv) oli selvästi suurempi kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa (keskimäärin 29,8 kg/pv) ja se todennäköisesti

mahdollisti fosforin tehokkaamman hyväksikäytön maidontuotannossa, ruokinnan suuremmasta fosforipitoisuudesta huolimatta.

Sonnan fosforipitoisuus oli suuntaa-antavasti pienempi ja sonnassa eritetyn fosforin määrä oli pienempi härkäpapuruokinnoilla kuin rypsirokuinnoilla, mikä oli odotettua, kun ruokinnan fosforipitoisuus pienentyi. Useiden tutkimusten (mm. Tallam ym. 2005, Elizondo Salazar ym. 2013, Wang ym. 2014) ja Klopín ym. (2013) meta-analyysin mukaan ruokinnan fosforipitoisuuden pienentyessä myös sonnan fosforipitoisuus pienentyy. Elizondo Salazar ym. (2013) raportoivat myös sonnan fosforin erityksen pienentyvän, kun ruokinnan fosforipitoisuus pienenee. Nyt tehdyssä tutkimuksessa sonnan fosforipitoisuudet olivat melko suuria ruokintojen fosforipitoisuuksiin nähden, koska fosforin näennäiset sulavuudet olivat tavallista pienempiä. Tallam ym. (2005) tutkimuksessa sonnan fosforipitoisuus oli pienempi kuin tässä tutkimuksessa, vaikka tutkimuksen toinen ruokinta sisälsi enemmän fosforia tämän tutkimuksen ruokintoihin verrattuna. Heidän tutkimuksessaan ruokintojen fosforipitoisuudet olivat 3,5 ja 4,7 g/kg ka ja sonnan fosforipitoisuudet 6,3 ja 8,9 g/kg ka. Wangin ym. (2014) tutkimuksessa sonnan fosforipitoisuus (6,5 g/kg ka) oli pienempi kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa, vaikka ruokinnan fosforipitoisuus oli saman suuruinen. Wangin ym. (2014) tutkimuksessa sonnan fosforipitoisuudet (9,0-10,9 g/kg ka) olivat samanlaisia kuin nyt tehdyssä tutkimuksessa, kun ruokinnan fosforipitoisuudet olivat 4,7-5,7 g/kg ka.

Ruokintojen fosforipitoisuuksien erot olivat varsin pieniä (0,01-0,17 g/kg ka) verrattuna muihin tutkimuksiin, jonka vuoksi erot sonnan fosforipitoisuuksissa jäivät luultavasti pieniksi. Suunta on kuitenkin muiden tutkimusten mukainen. Jo näin pienillä ruokinnan ja sonnan fosforipitoisuus eroilla fosforia erittyi sonnassa 8,55 g/lehmä vähemmän härkäpapuruokinnoilla kuin rypsirokuinnoilla. Tuotantokauden aikana (305 pv) tämä vähentäisi sonnassa eritettyä fosforia n. 2,6 kg/lehmä, eli esimerkiksi 100 lehmän karjassa n. 260 kg fosforia vuodessa. Tämä osoittaa, että pienilläkin ruokinnallisilla muutoksilla on mahdollista vähentää lypsykarjan fosforipäästöjä ympäristöön. On kuitenkin otettava huomioon rypsirokuokintojen suurempi maitotuotos verrattuna härkäpapuruokintoihin. Kun tarkastellaan sonnan fosforin eritystä/maitokilo, erot ovat pienemmät. Rypsirokuinnoilla sonnan eritettiin 2,17 g/maitokilo ja härkäpapuruokinnoilla 1,98 g/maitokilo.

Lannoituksessa tulee huomioida 100 % sonnan fosforista (Mavi 2018 lisää viite). Epäorgaaninen fosfori on kasveille käyttökelpoisessa muodossa (Uusitalo ym. 2007a) ja kun se liukenee maaperässä olevaan veteen, kasvit hyödyntävät sen nopeasti (Hartikainen 2002). Tutkimuksemme tulos tukee Mavin (2018) ohjeistusta, koska tutkimukssamme suurin osa (n. 96 %) sonnassa eritetystä fosforista oli epäorgaanista fosforia.

Liukoisen fosforin pitoisuus oli suuntaa-antavasti suurempi ja erityis suurempi sonnassa rypsirokinnoilla kuin härkäpapuruokinnoilla. Dou ym. (2010) havaitsivat, että sonnan fosforipitoisuuden suurentuessa, liukoisen fosforin osuus sonnan kokonaisfosforista suurenee. Kuitenkin nyt tehdyssä tutkimuksessa liukoisen fosforin pitoisuus sonnassa oli pienempi kuin aiemmissa tutkimuksissa (Chapuis-Lardy ym. 2004, Dou ym. 2010). Chapuis-Lardyn ym. (2004) tutkimuksessa liukoisen fosforin pitoisuus sonnassa oli 2,55-6,79 g/kg ka ja Doun ym. (2010) tutkimuksessa 1,92-10,55 g/kg. On epäselvää, miksi nyt tehdyssä tutkimuksessa sonnan liukoisen fosforin pitoisuudet ovat niin pienet verrattuna muihin tutkimuksiin.

Virtsan fosforipitoisuus (Elizondo Salazar ym. 2013, Wang ym. 2014) ja virtsassa eritetyn fosforin määrä (Ferris ym. 2010, Puggaard ym. 2011, Puggaard ym. 2014) oli samalla tasolla kuin aiemmissa tutkimuksissa. Osassa aiemmista tutkimuksissa ruokinnan fosforipitoisuudella ei ollut vaikutusta virtsan fosforipitoisuuteen (Elizondo Salazar ym. 2013) tai virtsassa eritetyn fosforin määrään (Ferris ym. 2010, Puggaard ym. 2014), mutta osassa tutkimuksessa havaittiin virtsan fosforipitoisuuden (Wang ym. 2014) tai virtsassa eritetyn fosforin määrän (Puggaard ym. 2011) pienentyvän lineaarisesti, kun ruokinnan fosforipitoisuus pieneni. Nyt tehdyssä tutkimuksessa virtsan fosforipitoisuuksissa tai virtsassa eritetyn fosforin määrissä ei havaittu muutoksia. Fosforin saannista pienin osa erittyi virtsaan. Virtsassa eritetyn fosforin määrä on niin pieni, ettei sillä ole vaikutusta esimerkiksi ympäristöpäästöjen kannalta.

Rypsirokinnoilla oli negatiivinen fosforitase eli lehmät käyttivät todennäköisesti luuston fosforivarastoja mm. maitotuotokseen. Ruokinnalla, joka sisälsi vain härkäpapua, fosforitase oli positiivinen eli lehmiin sitoutui fosforia, todennäköisesti luustoon, mutta härkäpapua ja spirulinaa sisältäneellä ruokinnalla fosforitase oli negatiivinen. Kuitenkin rypsirokinnoilla fosforin saanti oli suurempaa kuin härkäpapuruokinnoilla. Fosforitase on yleensä negatiivinen alkutuotoskaudesta johtuen fosforin mobilisaatiosta luukudoksesta,

riippumatta ruokinnan fosforipitoisuudesta (Elizondo Salazar ym. 2013). Alkutuotoskauden jälkeen fosforitase kääntyy usein positiiviseksi (Elizondo Salazar ym. 2013). Tässä tutkimuksessa lehmät olivat keskituotoskaudessa, joten todennäköisesti fosforin tavallista pienempi näennäinen sulavuus, rypsiuokintojen suurempi maitotuotos ja maitoon sitoutuneen fosforin määrä olivat syynä negatiiviseen fosforitaseeseen rypsiuokinnalla. Härkäpapuruokinnalla maitotuotos ja maitoon sitoutunut fosforimäärä olivat pienemmät kuin rypsiuokinnalla, jonka vuoksi fosforitaseet olivat suuremmat härkäpapuruokinnalla kuin rypsiuokinnalla. Kuitenkin härkäpapua ja spirulinaa sisältäneellä ruokinnalla maitotuotos oli suurempi kuin pelkästään härkäpapua sisältäneellä ruokinnalla, jonka vuoksi fosforitase oli todennäköisesti negatiivinen.

9 Johtopäätökset

Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia miten rypsin korvaaminen härkäpavulla ja näiden valkuaisrehujen osittaisen korvaaminen spirulinalla vaikuttaa syöntiin, maidontuotantoon ja fosforin hyväksikäyttöön. Tutkimuksen perusteella härkäpapu ja spirulina eivät ole maitotuotosvasteeltaan rypsin veroisia valkuaisrehuja lypsylehmän ruokinnassa. Härkäpapu tuotti rypsiä pienemmän maitotuotosvasteen todennäköisesti härkäpavun huonomman aminohappotasapainon ja suuremman valkuaisen pötsihajoavuuden takia. Spirulina tuotti rypsiuokinnalla pienemmän maitotuotosvasteen kuin härkäpapuruokinnalla. Todennäköisesti spirulina täydensi härkäpavun aminohappokoostumusta ainakin metioniinin osalta. Spirulina pienensi kuiva-aineen syöntiä heikomman maittavuuden vuoksi. Rypsin korvaaminen härkäpavulla pienensi ruokinnan fosforipitoisuutta, koska rypsin fosfori:raakavaluaissuhde oli suurempi kuin härkäpavun. Spirulinalla korvaaminen pienensi rypsiuokinnalla ruokinnan fosforipitoisuutta, koska spirulinalla fosfori:raakavaluaissuhde oli pienempi kuin rypsin. Fosforin näennäinen sulavuus oli tavallista pienempi tässä tutkimuksessa, mikä selittää tavallista suuremman sonnan fosforipitoisuuden.

Jotta ruokinnan pienemmästä fosforipitoisuudesta on hyötyä fosforin hyväksikäyttöön maidontuotannossa, ruokinta tulee koostaa niin, että maitotuotos ei pienene, koska maidon mukana eritetään merkittävä osa saadusta fosforista. Ruokinta, joka sisältää sekä härkäpapua että spirulinaa, saattaisi olla fosforin hyväksikäytön kannalta hyvä vaihtoehto, koska tällä ruokinnalla maitotuotos oli suurempi kuin pelkällä härkäpapuruokinnalla ja

fosforin erityis sonnassa oli pienempi kuin rypsirokinnoilla. Perusvalkuaisrehun osittainen korvaaminen spirulinalla tehosti suuntaa-antavasti fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa. Tämä osoitti, että härkäpavun käyttö valkuaisrehuna rypsin sijaan voi olla toimiva keino tehostaa fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa, kun härkäpavun maidontuotantovastetta parannetaan täydentämällä sen aminohappokoostumusta metioniinipitoisella rehulla. Myös spirulina rypsin osittaisena korvaajana on potentiaalinen valkuaisrehu tehostamaan fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa, mikäli löydetään keino ehkäistä spirulinan aiheuttama kuiva-aineen syönnin pienentyminen ja sen myötä pienentynyt maitotuotos.

10 Kiitokset

Haluan kiittää tohtorikoulutettava Marjukka Lammista ja yliopistonlehtori Seija Jaakkola erinomaisesta ohjauksesta tätä tutkielmaa kirjoittaessa. Sain teiltä paljon apua sekä kattavat ja selkeät vastaukset kysymyksiini.

Kiitos Henna, Aino, Maria, Sini, Lotta ja Vappu – olette korvaamattomia ystäviä ja olleet suurena apuna opintojeni aikana. Kiitos myös Villelle ja perheelleni tuesta ja kannustuksesta.

11 Lähteet

- Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P. & Varvikko, T. 2000. Determination of reticulo-rumen and whole-stomach digestion in lactating cows by omasal canal or duodenal sampling. *British Journal of Nutrition* 83: 67–77.
- Bannink, A., Šebek, L. & Dijkstra, J. 2010. Efficiency of phosphorus and calcium utilization in dairy cattle and implications for the environment. Teoksessa: Vitti, D. M. S. S. & Kebreab, E. (toim.). Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals. CABI, Wallingford, Iso-Britannia. s.151-172.
- Becker, E. W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25: 207-210.
- Bjelland, D. W., Weigel, K. A., Hoffman, P. C., Esser, N. M. & Coblenz, W. K. 2011. The effect of feeding dairy heifers diets with and without supplemental phosphorus on growth, reproductive efficiency, health, and lactation performance¹. *Journal of Dairy Science* 94: 6233-6242.
- Boney, J. W. & Moritz, J. S. 2017. The effects of Spirulina algae inclusion and conditioning temperature on feed manufacture, pellet quality, and true amino acid digestibility. *Animal Feed Science and Technology* 224: 20-29.
- Chapuis-Lardy, L., Fiorini, J., Toth, J. & Dou, Z. 2004. Phosphorus Concentration and Solubility in Dairy Feces: Variability and Affecting Factors. *Journal of Dairy Science* 87: 4334 – 4341.
- Costa, D. F. A., Quigley, S. P., Isherwood, P., McLennan, S. R. & Poppi, D. P. 2016. Supplementation of cattle fed tropical grasses with microalgae increases microbial protein production and average daily gain. *Journal of Animal Science* 94: 2047-2058.
- Crépon, K., Marget, P., Peyronnet, C., Carrouée, B., Arese, P. & Duc, G. 2010. Nutritional value of faba bean (*Vicia Faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research* 115: 329-339.

- Dou, Z., L. Chapuis-Lardy, J. Fiorini, J. D. Toth, & J. D. Ferguson. 2007. A novel approach for reducing potential phosphorus loss on dairy farms. *Environmental Science and Technology* 41: 4361-6.
- Dou, Z., Ramberg, C. F., Chapuis-Lardy, L., Toth, J. D., Wu, Z., Chase, L. E., Kohn, R. A., Knowlton, K. F. & Ferguson, J. D. 2010. A fecal test for assessing phosphorus overfeeding on dairy farms: Evaluation using extensive farm data. *Journal of Dairy Science* 93: 830-839.
- Durand, M. & Komisarczuk, S. 1988. Influence of major minerals on rumen microbiota. *Journal of Nutrition* 118: 249-260.
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T. & Webster, G. 1989. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72: 68-78.
- Ekelund, A., Spörndly, R., Valk, H. & Murphy, M. 2005. Effects of varying monosodium phosphate intake on phosphorus excretion in dairy cows. *Livestock Production Science* 96: 301-306.
- Elizondo Salazar, J.A., Ferguson J.D., Beegle D.B., Remsburg D.W. & Wu Z. 2013. Body phosphorus mobilization and deposition during lactation in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 502-14.
- Fang, R. J., Li, T. J., Yin, F. G., Yin, Y. L., Kong, X. F., Wang, K. N., Yuan, Z., Wu, G. Y., He, J. H., Deng, Z. Y. & Fan, M. Z. 2007. The additivity of true or apparent phosphorus digestibility values in some feed ingredients for growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 20: 1092-1099.
- Ferris, C. P., McCoy, M. A., Patterson, D. C. & Kilpatrick, D. J. 2010. Effect of offering dairy cows diets differing in phosphorus concentration over four successive lactations: 2. Health, fertility, bone phosphorus reserves and nutrient utilisation. *Cambridge University Press* 4: 560-571.
- Friedel, K. 1990. Die Schätzung des energetischen Futterwertes von Grobfutter mit Hilfe einer Cellulasemethode. [The estimation of the energetic feeding value of roughages

by means of a cellulase method]. Wissenschaftliche Zeitung Universitet Rostock, N-Reihe 39: 78–86.

George, S. K., Dipu, M. T., Mehra, U. R., Singh, P., Verma, A. K. & Ramgaokar, J. S. 2006. Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine. *Journal of Chromatography B* 832: 134-137.

Hartikainen, H. 2002. Kasveille käyttökelpoiset fosforivarat maassa. Teoksessa: Uusitalo, R. & Salo, R. (toim.). 2002. Tutkittu maa – turvalliset elintarvikkeet. Maa- ja elintarviketalous 13. 64 s.

Horst, R. L. 1986. Regulation of Calcium and Phosphorus Homeostasis in the Dairy Cow. *Journal of Dairy Science* 69: 604-616.

Huhtanen, P., Hetta, M. & Swensson, C. 2011. Evaluation of canola meal as a protein supplement for dairy cows: A review & meta-analysis. *Canadian Journal of Animal Science* 91: 529–543.

Huhtanen, P., Nousiainen, J. & Rinne, M. 2006. Recent developments in forage evaluation with special reference to practical applications. *Agricultural and Food Science* 15: 293–323.

Huhtanen, P., Nousiainen, J., Tuori, E. & Turtola, E. 2009. Maitotilan fosforikierron mallintaminen. Julkaisussa E. Turtola ja K. Ylivainio. 2009. Suomen kotieläintalouden fosforikierto – säätöpotentiaali maataloilla ja aluetasolla. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT). Maa- ja elintarviketalous 138. 244 s.

Huhtanen, P. & Rinne, M. 2007. Effects of increasing the milk yield of dairy cows on milk composition. *Journal of Animal Feed Sciences*. 16: 42-58.

Huhtanen, P., Rinne, M., Mäntysaari, P. & Nousiainen, J. 2011. Integration of the effects of animal and dietary factors on total dry matter intake of dairy cows fed silage-based diets. *Animal* 5: 691–702.

Huhtanen, P., Rinne, M. & Nousiainen, J. 2007. Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: a revision of the relative silage dry-matter intake index. *Animal* 1: 758–770.

- Huida, L., Väättäinen, H. & Lampila, M. 1986. Comparison of dry matter contents in grass silages as determined by oven drying and gas chromatographic water analysis. *Annales Agriculturae Fenniae* 25: 215–230.
- Humer, E. & Zebeli, Q. 2015. Phytate in feed ingredients and potentials for improving the utilization of phosphorus in ruminant nutrition. *Animal Feed Science and Technology* 209: 1-15.
- Huuskonen, A., Khalili, H. & Joki-Tokola, E. 2007. Effects of three different concentrate proportions and rapeseed meal supplement to grass silage on animal performance of dairy-breed bulls with TMR feeding. *Livestock Science* 110: 154–165.
- Jarrett, J. P., Wilson, J. W., Ray, P. P. & Knowlton, K. F. 2014. The effects of forage particle length and exogenous phytase inclusion on phosphorus digestion and absorption in lactating cows. *Journal of Dairy Science* 97: 411-418.
- Jokela, M., Jaakkola, S. & Huhtanen, P. Ruokinnan vaikutus maidon koostumukseen ja laatuun. Julkaisussa: Jokela, M., Jaakkola, S., Huhtanen, P., Rokka, T., Korhonen, H., Salo-Väänänen, P. & Piironen, V. 1998. Keskeisten alkutuotantotekijöiden ja prosessoinnin vaikutus maidon laatuun. Kirjallisuuskatsaus. Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja. Sarja A 41. Jokioinen: Maatalouden tutkimuskeskus. 96 s.
- Kaukovirta-Norja, A., Leinonen, A., Morkkila, M., Wessberg, N. & Niemi, J. 2015. Tiekartta Suomen proteiiniomavaraisuuden parantamiseksi. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. 73 s.
- Kincaid, R. L. & Rodehutsord, M. Phosphorus metabolism in the rumen. 2005. Teoksessa: Pfeffer, E., Hristov, A. N. (toim.). Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle: reducing the environmental impact of cattle operations. CABI, Wallingford, Iso-Britannia. s. 187-193.
- Kincaid, R. L., Garikipati, D. K., Nennich, T. D. & Harrison, J. H. 2005. Effect of Grain Source and Exogenous Phytase on Phosphorus Digestibility in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 88: 2893-2902.

- Klop, G., Ellis, J. L., Bannink, A., Kebreab, E., France, J. & Dijkstra, J. 2013. Meta-analysis of factors that affect the utilization efficiency of phosphorus in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96: 3936-3949.
- Knowlton, K. F. & Herbein, J. H. 2002. Phosphorus Partitioning During Early Lactation in Dairy Cows Fed Diets Varying in Phosphorus Content¹. *Journal of Dairy Science* 85: 1227-1236.
- Knowlton, K. F., Radcliffe, J. S., Novak, C. L., & Emmerson, D. A. 2004. Animal management to reduce phosphorus losses to the environment. *American Society of Animal Science*. 82 (E.suppl): E173-E195.
- Kyntäjä, S., Partanen, K., Siljander-Rasi, H. & Jalava, T. 2014. Tables of composition and nutritional values of organically produced feed materials for pigs and poultry. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT) raportti 164. 37 s.
- Lamminen, M. E., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T. J., Jaakkola, S. L. & Vanhatalo, A. O. 2016 Energy and protein metabolism and nutrition: 5th EAAP International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition. Skomiał, J. & Lapierre, H. (toim.). Wageningen: Wageningen Academic Publishers. EAAP Publication no. 137. s. 285–287.
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Simpura, I., Jaakkola, S. & Vanhatalo, A. 2017. Comparison of microalgae and rapeseed meal as supplementary protein in the grass silage based nutrition of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 234: 295-311.
- Lemola, R., Nousiainen, J., Huhtanen, P. & Turtola, E. 2009. Fosforikierron biologinen säätövara ja sen vaikutus maatalouden fosforikuormitukseen. Julkaisussa E. Turtola & K. Ylivainio. 2009. (toim.). Suomen kotieläintalouden fosforikierto – säätöpotentiaali maatiloilla ja aluetasolla. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT). Maa- ja elintarviketalous 138. 244 s.
- Løvendahl, P. & Sehested, J. 2016. Short communication: Individual cow variation in urinary excretion of phosphorus. *Journal of Dairy Science* 99: 4580-4585.

- Luke 2018. Rehutaulukot ja ruokintasuositukset. Luonnonvarakeskus. [Viitattu 16.4.2018]. Saatavissa: <http://www.luke.fi/rehutaulukot>.
- Mavi 2018. Lannoitus ja ympäristökorvaus. Maaseutuvirasto. [Viitattu 23.4.2018.] Saatavissa: <http://www.mavi.fi/fi/tuet-ja-palvelut/viljelijä/Sivut/lannoitus.aspx>. Päivitetty 2016.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17: 297–304.
- Morse, D., Head, H. H. & Wilcox, C. J. 1992a. Disappearance of Phosphorus in Phytate from Concentrates In Vitro and from Rations Fed to Lactating Dairy Cows¹. 1979-1986. *Journal of Dairy Science* 75: 1979-1986.
- Morse, D., Head, H. H., Wilcox, C. J., Van Horn, H. H., Hissem, C. D. & Harris, B. 1992b. Effects of Concentration of Dietary Phosphorus on Amount and Route of Excretion¹. *Journal of Dairy Science* 75: 3039-3049.
- Mustonen, A., Virkajärvi, P., Hyrkäs, M., Suomela, R. & Kauppila R. 2014. Seitsemän lihavaa vuotta – vieläkö nurmen fosforilannoituksesta voidaan tinkiä? Maataloustieteen Päivät 2014 [verkkojulkaisu]. Suomen Maataloustieteellisen Seuran julkaisuja no 30. Toim. Mikko Hakojärvi ja Nina Schulman. Viitattu [18.4.2018]. Julkaistu 9.1.2014. Saatavilla Internetissä: www.smts.fi (Seitsemän lihavaa vuotta – vieläkö nurmen fosforilannoituksesta voidaan tinkiä?). ISBN 978-951-9041-58-2.
- Mäkinen, H. 2016. Rypsi, härkäpapu ja mikrolevä (*Spirulina Platensis*) lypsylehmien valkuaistäydennyksenä – vaikutus pötsikäymiseen, plasman energiametaboliitteihin ja maidontuotantoon. Maisterintutkielma Helsingin Yliopisto. 55 s.
- National, R. C. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 2001. Washington, D.C.: National Academy Press, Washington D.C., Yhdysvallat. 7. painos. 408 s.
- Niemi, J. & Väre, M. (toim.). 2017. Suomen maa- ja elintarviketalous. Luonnonvarakeskus (Luke), Helsinki. 90 s.
- Nousiainen, J., Rinne, M., Hellämäki, M. & Huhtanen, P. 2003. Prediction of the digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity

- from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. *Animal Feed Science and Technology* 103: 97–111.
- Odongo, N. E., McKnight, D., KoekKoek, A., Fisher, J. W., Sharpe, P., Kebreab, E., France, J. & McBride, B. W. 2007. *Canadian Journal of Animal Science* 87: 639-646.
- Puggaard, L., Kristensen, N. B. & Sehested, J. 2011. Effect of decreasing dietary phosphorus supply on net recycling of inorganic phosphate in lactating dairy cows. *Livestock Science* 94: 1420-1429.
- Puggaard, L., Lund, P., Liesegang, A. & Sehested, J. 2014. Long term effect of reduced dietary phosphorus on feed intake and milk yield in dry and lactating dairy cows. *Livestock Science* 159: 18-28.
- Puhakka, L., Jaakkola, S., Simpura, I., Kokkonen, T. & Vanhatalo, A. 2016. Effects of replacing rapeseed meal with fava bean at 2 concentrate crude protein levels on feed intake, nutrient digestion, and milk production in cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 99: 7993-8006.
- Reid, M., O'Donovan, M., Elliott, C. T., Bailey, J. S., Watson, C. J., Lalor, S. T. J., Corrigan, B., Fenelon, M. A. & Lewis, E. 2015. The effect of dietary crude protein and phosphorus on grass-fed dairy cow production, nutrient status, and milk heat stability. *Journal of Dairy Science* 98: 517-531.
- Robinson, B. H. 2010. Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livestock Science* 127: 115-126.
- Saarela, I., Huhta, H. & Virjajärvi, P. 2006. Effects of repeated phosphorus fertilization on field crops in Finland 2. Sufficient phosphorus application rates on silty and sandy soils. *Agricultural and Food Science* 15: 423-443.
- Salo, M.-L. & Salmi, M. 1968. Determination of starch by the amyloglucosidase method. *The Journal of Scientific Agricultural Society of Finland* 40: 38–45.

- Salo, M.-L. 1965. Determination of carbohydrate fractions in animal foods and faeces. *Acta Agraria Fennica* 105: 1–102.
- Sjaunja, L.O., Baevre, L., Junkarinen, L., Pedersen, J. & Setälä, J. 1990. A Nordic proposal for an energy corrected milk (ECM) formula. Teoksessa: Performance Recording of Animals: State of the Art- 1990. Toim. Gaillon, P. & Chabert, Y. PUDOC, Wageningen, Alankomaat: EAAP Publication no. 50: 156–157.
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61–68.
- Suomen ympäristökeskus 2018. http://www.ymparisto.fi/fi-FI/Kartat_ja_tilastot/Vesistojen_kuormitus_ja_luonnon_huuhtouma. Julkaistu 2013, viitattu 20.3.2018.
- Suttle, N. F. 2010. Mineral Nutrition of Livestock. 2010. CABI, Wallingford, Iso-Britannia. 4. painos. 544 s.
- Tallam, S. K., Ealy, A. D., Bryan, K. A. & Wu, Z. 2005. Ovarian Activity and Reproductive Performance of Dairy Cows Fed Different Amounts of Phosphorus. *Journal of Dairy Science* 88: 3609-3618.
- Tarsia, E. 2016. Rypsin, härkäpavun ja *Spirulina platensis*-mikrolevän vaikutukset lypsylehmien valkuaisen hyväksikäyttöön. Maisterintutkielma Helsingin Yliopisto. 60 s.
- Tokusoglu, Ö. & Ünal, M. K. 2003. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science* 68: 1144-1148.
- Tuori, M., Rinne, M., Vanhatalo, A. & Huhtanen, P. 2006. Omasal sampling technique in estimation of the site and extent of mineral absorption in dairy cows fed rapeseed and soybean expellers. *Agricultural and Food Science* 15: 219-234.
- Uusitalo R., Ekholm P., Turtola E., Pitkänen H., Lehtonen H., Granlund K., Bäck S., Puustinen M., Räike A., Lehtoranta J., Rekolainen S., Walls M. & Kauppila P. 2007a. Maatalous Itämeren rehevöittäjänä. *Maa- ja elintarviketalous* 96. 34 s.

- Uusitalo R., Turtola E., Grönroos J., Kivistö J., Mäntylähti V., Turtola A., Lemola R. & Salo T. 2007b. Finnish trends in phosphorus balances and soil test phosphorus. *Agricultural and food science* 16: 301-316.
- Valadares, R.F.D., Broderick, G.A., Valadares Filho, C. & Clayton, M.K. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science* 82: 2686-2696.
- Valk, H., Šebek, L. B. J. & Beynen, A. C. 2002. Influence of Phosphorus Intake on Excretion and Blood Plasma and Saliva Concentrations of Phosphorus in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 88: 2642-2649.
- Valk, H. & Šebek, L. B. J. 1999. Influence of Long-Term Feeding of Limited Amounts of Phosphorus on Dry Matter Intake, Milk Production, and Body Weight of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 82: 2157-2163.
- Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V. & Varvikko, T. 1999. Response of dairy cows fed grass silage diets to abomasal infusions of histidine alone or in combinations with methionine and lysine. *Journal of Dairy Science* 82: 2674-2685.
- Van Keulen, J. & Young, B. A. 1977. Evaluation of insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science* 44: 282-287.
- Van Krimpen, M. M., Bikker, P., Van der Meer, I. M., Van der Peet-Schwering, C. M. C. & Vereijken, J. M. 2013. Cultivation, processing and nutritional aspects for pigs and poultry of European protein sources as alternatives for imported soyabean products. Wageningen UR Livestock Research. Report 662. <http://edepot.wur.nl/250643>.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583–3597.
- Wang C., Liu Z., Wang D., Liu J., Liu H. & Wu Z. 2014. Effect of dietary phosphorus content on milk production and phosphorus excretion in dairy cows. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5: 1-6.

- Wikimedia Commons. File:Phytic acid.svg. Saatavissa: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phytic_acid.svg. Päivitetty 30.10.2017. [Viitattu 2.5.2018].
- Wu, Z. & Satter, L. D. 2000. Milk Production and Reproductive Performance of Dairy Cows Fed Two Concentrations of Phosphorus for Two Years¹. *Journal of Dairy Science* 83: 1052-1063.
- Yoshida, M. & Hoshii, H. 1980. Nutritive value of Spirulina green algae for poultry feed. *Japanese Poultry Science* 17: 27-30.
- Yrjänäinen S., Nousiainen J., Kytölä K., Khalili H. & Huhtanen P. 2003. Ruokinnalliset mahdollisuudet parantaa fosforin hyväksikäyttöä maidontuotannossa. Julkaisussa E. Turtola ja K. Ylivainio. 2009. Suomen kotieläintalouden fosforikierto – säätöpotentiaali maatiloilla ja aluetasolla. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus (MTT). Maa- ja elintarviketalous 138. 244 s.